

Desenvolvimento de um modelo *ex vivo* de envelhecimento em culturas organotípicas de hipocampo

(versão final após defesa)

Luiza Maria Ferreira Lopes Athayde

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Liliana Inácio Bernardino

Covilhã, novembro de 2023

Declaração de Integridade

Eu, Luiza Maria Ferreira Lopes Athayde, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11369 de Ciências Biomédicas da UBI - Universidade da Beira Interior, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 03 /10 /2023



Agradecimentos

O desenvolvimento e a realização desta dissertação de Mestrado, que, sobretudo, é a realização de um sonho, só foram possíveis pelo apoio incondicional do meu companheiro na vida, Sergio Fachini Junior, a quem agradeço primeiramente. À minha orientadora, Prof.^a Doutora Liliana Bernardino, por ter aceite o meu pedido de orientação, por todo o apoio e conhecimentos partilhados que me ajudaram a superar os desafios na aprendizagem e aperfeiçoamento de novas técnicas e capacidades.

Agradeço a todos os amigos, colegas, que diretamente ou indiretamente contribuíram para desenvolvimento do meu trabalho, aos colaboradores dos laboratórios do CICS, especialmente à Maria José Pinto, o meu sincero obrigada.

O meu muito obrigada às colegas do Brain Repair Group, em especial à Ana Catarina Almeida, por toda a ajuda, senso crítico, apoio técnico e emocional nas horas mais difíceis e nas mais engraçadas também, uma amiga que a UBI me presenteou.

Quero agradecer à minha filha, Maria Clara e à minha família, que está no Brasil, e mesmo de longe, sempre acreditaram em mim, me apoiaram e incentivaram. Um imenso obrigada!

Resumo

A expectativa de vida aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Relatórios das Nações Unidas revelam que o número de pessoas com mais de sessenta anos de idade está a aumentar mais rapidamente que em grupos etários mais jovens em todo o mundo. O envelhecimento é um processo fisiológico, com diversos mecanismos que podem desencadear efeitos cruciais no surgimento de doenças neurodegenerativas. A principal característica do envelhecimento é a acumulação de células senescentes, no qual, o stress oxidativo, está implicado diretamente. Diante da complexidade do envelhecimento, é imprescindível a compreensão dos mecanismos moleculares relativos a esse processo. Atualmente, os modelos experimentais utilizados para investigar o envelhecimento cerebral são *in vitro* e *in vivo*, que por sua vez, trazem algumas desvantagens. Como tal, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um novo modelo *ex vivo* de envelhecimento cerebral, utilizando o composto terc-butil hidroperóxido (t-BHP) em culturas organotípicas de hipocampo de murganhos C57BL/6J com 6 a 9 dias de idade. As culturas foram expostas a um tratamento sub-crônico com t-BHP com o objetivo de induzir stress oxidativo, e conseqüentemente, a senescência. A indução de senescência celular foi avaliada através do ensaio da β -galactosidase, enquanto a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de lactato desidrogenase (LDH). A expressão dos marcadores de senescência (SA- β -gal), stress oxidativo (SOD2), sobrevivência e atividade neuronal (NeuN e DCX), foram analisados por Western blotting. Verificou-se que o t-BHP (10 μ M e 25 μ M) não induziu um aumento na atividade da β -galactosidase, sugerindo que este tratamento não foi capaz de induzir senescência. Contudo, o tratamento com 25 μ M t-BHP induziu morte celular avaliada através do ensaio LDH. Foi verificada uma tendência no aumento da expressão de SOD2 (com a concentração de 25 μ M t-BHP), e quanto à sobrevivência e dinâmica neuronal, não foram observadas alterações significativas. Em suma, os resultados sugerem que a indução da senescência, nos parâmetros utilizados neste estudo, não foi suficiente para o estabelecimento do modelo. Para se alcançarem conclusões mais robustas, será necessário realizar-se estudos adicionais de mecanismos de stress oxidativo e senescência celular em culturas organotípicas de hipocampo.

Palavras-chave

Envelhecimento; Stress oxidativo; Senescência celular; Culturas organotípicas de hipocampo

Abstract

Life expectancy has increased considerably in recent decades. United Nations Reports reveal that the number of people over sixty years of age is increasing faster than younger age groups across the world. Aging is a physiological process, with several mechanisms that can trigger crucial effects in the etiology of neurodegenerative diseases. The main characteristic of aging is the accumulation of senescent cells. However, oxidative stress is directly implicated. Given the complexity of aging, it is necessary to understand the molecular mechanisms related to this process. Currently, the experimental models used to investigate brain aging are *in vitro* and *in vivo*, which in turn, bring some disadvantages. Therefore, the objective of this work was to establish a new *ex vivo* model of brain aging, using the compound tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) in organotypic hippocampal cultures of C57BL/6J mice aged 6 to 9 days. The cultures were exposed to a sub chronic treatment with t-BHP with the aim of inducing oxidative stress, and consequently senescence. The induction of cellular senescence was assessed using the β -galactosidase assay, while cellular viability was assessed using the LDH assay. The expression of senescence markers (SA- β -gal), oxidative stress (SOD2), survival and neuronal activity (NeuN and DCX), were assessed by Western blotting. It was found that t-BHP (10 μ M and 25 μ M) did not induce an increase in β -galactosidase activity, indicating that this treatment was not capable of inducing senescence. However, treatment with 25 μ M t-BHP induced cell death assessed through the LDH assay. A trend of increased SOD2 expression was obtained at the concentration of 25 μ M and regarding neuronal survival and dynamics, no significant changes were observed. In short, the results suggest that the induction of senescence, in the parameters used in this study, were not sufficient to establish the model. To achieve more robust lessons, more studies of mechanisms of oxidative stress and cellular senescence in organotypic hippocampal cultures will be necessary.

Keywords

Aging; Oxidative stress; Cellular senescence; Organotypic hippocampal cultures

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1. Mecanismos Fisiopatológicos do Envelhecimento	2
1.1 Stress Oxidativo – Mecanismo subjacente à Senescência Celular	10
1.2 Modelos animais de envelhecimento	12
1.3 Modelo animal <i>ex vivo</i>	13
Capítulo 2 - Objetivos	15
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	16
1. Animais	16
2. Culturas organotípicas de fatias de hipocampo	16
3. Indução da Senescência	17
4. Determinação da viabilidade celular - Ensaio de LDH	18
5. Determinação da Senescência celular - Ensaio da β -galactosidase	19
6. Western Blotting	19
6.1 Extração e quantificação proteica	19
6.2. Immunoblot	20
7. Análise de Dados	20
Capítulo 4 - Resultados	21
1. Efeito do tratamento com t-BHP na indução da senescência celular	21
2. Efeito do tratamento com t-BHP na viabilidade celular	23
3. Efeito do tratamento com t-BHP no stress oxidativo	23
4. Efeito do tratamento com t-BHP na sobrevivência neuronal	24
Capítulo 5 - Discussão	26
Capítulo 6 – Perspectivas Futuras	31
Capítulo 7 – Referências Bibliográficas	32

Lista de Figuras

Figura 1 – Mecanismo de controle do ciclo celular, reparação do DNA, senescência e apoptose

Figura 2 – Acumulação de células senescentes e seus impactos no envelhecimento

Figura 3 – Representação do mecanismo de stress oxidativo em células neuronais

Figura 4 - Representação dos níveis de ROS aumentados frente aos mecanismos oxidantes

Figura 5 - Esquema ilustrativo do procedimento experimental para a realização de culturas organotípicas de hipocampo de murganhos

Figura 6 - Paradigma experimental para estabelecer o modelo de envelhecimento induzido pelo composto t-BHP em fatias organotípicas de hipocampo de murganhos

Figura 7 – Campos de fatias de hipocampo com coloração de SA- β -galactosidase e níveis de expressão de β -galactosidase

Figura 8 – Citotoxicidade induzida por t-BHP em fatias de hipocampo – Ensaio LDH

Figura 9 – Níveis de expressão de SOD2

Figura 10 - Níveis de expressão de NeuN e DCX

Lista de Acrónimos

AMPA	Ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
ATP	Adenosina Trifosfato
Bcl2	Linfoma 2 de células B
CerS2	Ceramida Sintase S2
CMA	Autofagia Mediada por Chaperonas
CSN	Células Estaminais Neurais
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DCX	<i>Doublecortin</i>
D-gal	D- galactosidase
DmPOLyA	DNA polimerase mitocondrial
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
DP	Doença de Parkinson
EV	Vesícula Extracelular
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GLB1	Galactosidase, beta 1
GluR1	Receptor 1 do Glutamato
GPX	Glutaciona Peroxidase
HAT	Histona-acetil transferase
HDAC	Histona desacetilase
HMGB1	<i>High Mobility group Box 1</i>
hRPE	Células do Epitélio da Retina Humana
hTERT	Transcriptase Reversa da Telomerase Humana
LAMP-1	Proteína de Membrana Lisossómica 1
LDH	Lactato Desidrogenase
LMNB1	Laminina B1
LMP	Permeabilização da Membrana Lisossómica 1
LRRK2	Repetição Rica em Leucina 2
MRPS12	Proteína Ribossómica Mitocondrial S12
mtDNA	DNA Mitocondrial
Neuro D1(ND1)	Fator de transcrição do tipo Neuro D
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NMDA	N-metil-D-aspartato
ORBEA	Órgão de Bem-Estar e Ética Animal
8-OXOdG	8-Oxo-2'-desoxiguanosina

OXPHOS	Sistema de Fosforilação Oxidativa Mitocondrial
PGC 1 α	Co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
RB	Retinoblastoma
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SA- β -gal	beta-galactosidase associada a Senescência
SASP	Fenótipo Secretor Associado a Senescência
SIRT	Sirtuína
Sirt 1	Histona desacetilase sirtuína 1
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD2	Superóxido Dismutase 2
SPN	Neurónio de projeção espinhosa do estriado dopaminérgico
SVG	Zona Subgranular
SVZ	Zona Subventricular
t-BHP	Terc-butil hidroperóxido
TERT	Transcriptase Reversa da Telomerase
TL	Comprimento dos Telómeros
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α

Capítulo 1

Introdução

A expectativa de vida aumentou consideravelmente nas últimas décadas devido às melhorias nas condições de vida e ao desenvolvimento contínuo de tecnologias nas diversas áreas, especialmente na saúde. Porém, desacelerar o processo de envelhecimento continua a ser um grande desafio. Segundo o Centro Regional de Informação das Nações Unidas, o número de pessoas com mais de sessenta anos de idade está a aumentar mais rapidamente que grupos etários mais jovens, dados estes, a nível mundial. Em 2019, a Europa apresentou percentagem mais alta até então - 25% da população apresentava idade superior a sessenta anos. O envelhecimento é um processo fisiológico, que envolve o declínio irreversível e progressivo da função fisiológica, onde inúmeras vias biológicas e genéticas estão diretamente relacionadas ao tempo de vida. O envelhecimento é também o principal fator de risco para várias doenças, entre elas, as neurodegenerativas [1-5].

A principal característica do envelhecimento é a acumulação de células senescentes. A senescência celular corresponde a uma resposta complexa a vários fatores intrínsecos e extrínsecos, como o stress, disfunção mitocondrial e o metabolismo bioenergético comprometido, o que, conseqüentemente, induz a secreção de fatores inflamatórios com fenótipo secretor associado a senescência (SASP), que por sua vez, produzem efeitos negativos no ambiente circundante. A senescência celular afeta consideravelmente a capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação de alguns tipos celulares, comprometendo a regeneração tecidual [1-4,6].

No século XX, surgiram muitos estudos sobre o envelhecimento levando à formulação de diversas hipóteses que tentam explicar este processo. Como por exemplo, a teoria evolutiva e pleiotropia antagónica (1952 e 1957), baseada nos conceitos de acumulações mutacionais deletérias em que o envelhecimento seria como um traço evolutivamente neutro ou antagonicamente pleiotrópico; a teoria programada (2005), que explica o envelhecimento (parcialmente, ou totalmente programado) e a morte como resultado de um programa genético que evoluiu para beneficiar as gerações futuras; a teoria dos radicais livres (1956), que é a acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS) advindos dos metabolitos dos componentes celulares, sugerindo que causa prejuízo aos componentes celulares, e que essa acumulação excessiva de espécies de oxigénio supera os mecanismos antioxidantes; e a teoria da hiperfunção (2008), sugere que a hiperatividade sustentada dos genes durante a janela da idade reprodutiva causa um estado de hipertrofia celular que resulta em envelhecimento, mas essa hiperatividade não está associada a dano celular. Tais teorias continuam em desenvolvimento, resultado dos contínuos avanços científicos e tecnológicos. Contudo, nenhuma dessas teorias foi comprovada de forma conclusiva no sentido de compreender qual a causa do envelhecimento, já que as

dificuldades de quantificar e definir adequadamente o envelhecimento são alguns dos entraves. A perspectiva do envelhecimento enquanto uma patologia, fornece a possibilidade de encontrar moléculas que atrasem esse processo. Desta forma, ainda há muito a ser esclarecido, como por exemplo, se o envelhecimento é programado ou se é o resultado de acumulações incorretas e aleatórias a nível celular e molecular que ocorrem com o avanço da idade. Perante a complexidade que envolve o processo de envelhecimento, é de suma importância compreender seus mecanismos fisiopatológicos para a elucidação dessas questões [6,7].

1. Mecanismos Fisiopatológicos do Envelhecimento

Com base em estudos com diferentes tipos de organismos, principalmente mamíferos, podemos afirmar que os seguintes fatores podem ser considerados determinantes do fenótipo do envelhecimento:

a) Instabilidade genómica

A acumulação de danos genéticos pode interromper a homeostase celular e resultar em instabilidade do genoma e exacerbar os danos ao DNA. Com o envelhecimento, aparecem defeitos no mecanismo de reparação do DNA, que afeta a expressão de genes importantes para a reparação e as vias de transcrição, levando à disfunção celular. Os danos ao genoma estão diretamente relacionados com o processo de envelhecimento. De acordo com os resultados dos estudos de Chen X., *et al* (2020) [8], foi demonstrado que múltiplas mutações non-sense na cinase de repetição rica em leucina 2 (LRRK2) estão associadas a sintomas de início tardio da doença de Parkinson (DP), que tem como principal fator de risco, o envelhecimento, e que a deficiência de *Lrrk2* acelerou a hipertrofia nuclear e induziu atrofia dendrítica, hipertrofia do corpo celular e invaginação nuclear em neurónios de projeção espinhosa do estriado dopaminérgico (SPNs) durante o envelhecimento. Esses resultados foram provenientes de análises de sequenciamento de RNA (RNA-seq) de tecidos do estriado isolados de *murganhos knockout* para *Lrrk2* (*Lrrk2* $-/-$) e controle (*Lrrk2* $+/+$) aos 2 e 12 meses de idade. Além disso, danos aumentados no DNA nuclear e metilações anormais de histonas também foram observados em neurónios estriatais *Lrrk2* envelhecidos, como também, foram observadas alterações das vias moleculares envolvidas na regulação da excitabilidade neuronal, estabilidade do genoma e homeostase proteica [1,9,10].

b) Redução dos telómeros

A telomerase é uma enzima transcriptase reversa cuja função canónica incide em alongar e manter o comprimento dos telómeros. Esta enzima é importante principalmente para as células em divisão que encurtam seus telómeros a cada ciclo de divisão celular. Durante o envelhecimento, a atividade da telomerase está comprometida, resultando na diminuição progressiva dos telómeros, e consequentemente desencadeará danos ao DNA que poderá levar à indução de processos de senescência celular. A ação da enzima telomerase ocorre em células

estaminais, essencial para o alongamento dos telômeros, contudo, a sua ação cessa após a diferenciação em células somáticas maduras. Em contrapartida, na maior parte de células tumorais, a atividade da telomerase encontra-se aumentada [1,9-13]. De acordo com Ding H., *et al* (2022) [11], o declínio da memória e comprometimento funcional social são manifestações comuns do envelhecimento acelerado na síndrome do pânico, onde a função da transcriptase reversa da telomerase (TERT) e o comprimento dos telômeros (TL) é anormal em pacientes com envelhecimento e síndrome do pânico, por isso, o estudo sugere que o gene da telomerase humana (hTERT) pode desempenhar um papel importante na patogênese das duas condições. O comprometimento da memória e a disfunção social são sinais de envelhecimento, e a exclusão do gene hTERT atenua a aquisição da memória do medo, assim como a metilação do hTERT modula a função cerebral local do giro pós-central para afetar a função social de pacientes com síndrome do pânico.

c) Epigenética

As modificações da cromatina, como alterações na metilação do DNA, nas histonas, acetilação, desacetilação e remodelação da cromatina, estão implicadas no envelhecimento celular. As respostas celulares às quebras das duplas cadeias de DNA podem ocasionar a perda da informação epigenética, e, com isso, a acelerar o processo de envelhecimento. Por exemplo, Yang J., *et al* (2023) [14], comprovou em leveduras, que a realocização de proteínas modificadoras de cromatina para as quebras das cadeias do DNA é uma característica do envelhecimento. Conforme relatado nos estudos de Barter e Foster (2018) [15], a expressão de histonas acetil-transferases (HAT), histonas desacetilases (HDAC) e moléculas reguladoras, estão alteradas no cérebro envelhecido e podem estar associadas às mudanças na transcrição de genes relacionados ao envelhecimento. Alterações epigenéticas na cromatina influenciam a expressão do gene SASP, como a histona desacetilase sirtuína 1 (Sirt1), uma enzima reguladora de SASP. O nível e a atividade de Sirt1 diminuem durante o envelhecimento, enquanto a senescência celular promove um aumento na atividade do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B). A ativação do NF- κ B pode promover a transcrição de vários genes associados à inflamação, assim como, a ativação de membros SASP. Com o envelhecimento, ocorre também a hipometilação global e local do DNA nas células de mamíferos [1,2,15,17]. De acordo com Maierhofer A., *et al* (2019) [16], confirmou-se que a metilação do DNA e as modificações das histonas foram aumentadas em modelos de murinhos com síndrome do envelhecimento prematuro. Ainda não há evidências de que a metilação do DNA possa ser alterada para prolongar a vida, mas foi demonstrado que as mudanças epigenéticas podem ser revertidas até certo ponto [11,12,17].

d) Perda de Proteostase

No processo de envelhecimento e na maior parte das doenças relacionadas com o envelhecimento, há um comprometimento da homeostase proteica, que resulta na agregação e na modificação pós-traducional de proteínas. As principais vias de degradação de proteínas são o sistema ubiquitina-proteassoma e a autofagia. Por exemplo, Nakamura e Yoshimori (2018) [18] indicam que o nível basal de atividade autofágica é essencial para a longevidade. O comprometimento da autofagia pode promover a acumulação de proteínas não processadas, além de dificultar o transporte axonal nos neurónios. Os estudos de Loeffler D.A., *et al* (2019) [19] em modelos experimentais, indicaram que a atividade autofágica no cérebro diminui com a idade, assim como as mudanças na atividade lisossômica. O aumento do conteúdo dos lisossomas é devido a alterações no processo de permeabilização da sua membrana lisossômica (LMP). Essa alteração leva ao comprometimento da autofagia e também ao vazamento do conteúdo lisossômico (proteínas e hidrolases) no citosol e consequente disfunção lisossomal. Conforme descrito por Gómez-Sintes R., *et al* (2016) [20], lisossomas envelhecidos tornam-se grandes e mais vulneráveis a LMP, o que afeta a correta função celular. Leeman D.S., *et al* (2018) [21] demonstraram alterações relacionadas à idade em células quiescentes e ativação de células estaminais neurais (CSN) no cérebro de murganhos. No estudo, as CSNs quiescentes foram caracterizadas por lisossomas grandes e com expressão aumentada de proteína da membrana lipossomal 1 (LAMP-1), além de acumulação de agregados decorrentes do comprometimento da degradação autofágica. A atividade lisossômica/autofágica comprometida pela idade, levou ao declínio da ativação das CSNs quiescentes em murganhos idosos. Conclui-se que a eficiência desses processos se encontra diminuída com o envelhecimento. Portanto, a manutenção da proteostase e a qualidade dessas vias são essenciais para a longevidade [1,22-26].

e) Esgotamento de células estaminais

O envelhecimento humano afeta todo o organismo, porém o envelhecimento cerebral possui características próprias, já que os neurónios são células pós-mitóticas altamente diferenciadas. A perda da capacidade regenerativa dos tecidos e órgãos também é uma das características importantes associada ao envelhecimento decorrente da senescência celular [1]. Já é estabelecido que as CSNs estão presentes no cérebro de mamíferos adultos e contribuem para a plasticidade cerebral ao longo da vida. É a partir das CSNs que ocorre a neurogênese, o processo a partir do qual estas células se diferenciam em novos neurónios e células gliais. Estes precursores neuronais estão localizados em nichos neurogênicos no cérebro de mamíferos adultos, nomeadamente, na zona subventricular (SVZ) dos ventrículos laterais e na zona subgranular (SGZ) do giro dentado do hipocampo [6]. O microambiente circundante das células estaminais é essencial para a manutenção das suas funções (proliferação e diferenciação). Enquanto a capacidade neurogênica das CSNs nos nichos SVZ em roedores é

mantida durante toda a vida adulta, em humanos, essa capacidade é bem mais reduzida. Os novos neurónios, além de manterem a integridade estrutural e a regeneração do tecido cerebral, são também necessários para a aprendizagem e memória. Durante o envelhecimento, a neurogênese diminui significativamente, no entanto, a capacidade de formação de novas sinapses em neurónios hipocampais varia um pouco conforme a idade. Diversos estudos mostraram que uma redução no nível de neurogênese do hipocampo corrobora com o desenvolvimento de deficiência na memória e na aprendizagem [26,29-40]. Portanto, no processo de envelhecimento, a diminuição da atividade das células estaminais, prejudica diretamente sua capacidade de auto-renovação, diferenciação e proliferação, e, conseqüentemente, várias funções cerebrais [26,29].

Foi relatado por Kalamakis G., *et al* (2019) [41] uma queda dramática no número de CSNs no processo de envelhecimento no cérebro de murganhos. Para a preservação dessa pequena população de CSNs e evitar o esgotamento total dessas células nos nichos neurogênicos, há uma indução à quiescência, o que dificultará a regeneração do cérebro envelhecido. As CSNs envelhecidas possuem um funcionamento semelhante às suas contrapartes mais jovens, quando ativadas, mas são mais resistentes a essa ativação.

f) Disfunção mitocondrial

A biogênese e bioenergética mitocondrial são determinantes na regulação do sistema nervoso central (SNC) e na neurogênese adulta. Foi demonstrado que a plasticidade metabólica (equilíbrio entre lipogênese e catabolismo lipídico) é importante na diferenciação das células neurais, portanto, uma redução no conteúdo mitocondrial e um menor metabolismo oxidativo foram observados em CSNs envelhecidas. Conseqüentemente, a neurogênese é prejudicada durante o envelhecimento. A disfunção mitocondrial pode causar um déficit na cadeia respiratória, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), reduzir os níveis de ATP, resultando em diversas doenças relacionadas ao envelhecimento [1,3,42].

Mutações que afetam o DNA mitocondrial (mtDNA) ou genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais podem prejudicar a função do sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS). Foi relatado que a acumulação de mutações somáticas do mtDNA desempenha um papel em certas doenças relacionadas à idade e é considerado um importante contributo para o processo do envelhecimento [6]. Vários estudos em mamíferos demonstraram que há um declínio progressivo da função mitocondrial com a idade, acompanhado por um aumento concomitante de mutações pontuais e deleções no mtDNA que podem ter origem nos erros de replicação [43,44].

De acordo com Kauppila T., *et al* (2018) [44], as conseqüências fisiológicas de diferentes níveis de mutações no mtDNA afetam principalmente os tecidos que requerem muita energia, por

exemplo, o sistema neuromuscular. Para determinar se mutações no mtDNA podem causar defeitos neuronais, foi testada a sensibilidade ao stress mecânico de moscas com mutação na subunidade catalítica da DNA polimerase mitocondrial (DmPOL γ A) como meio de introduzir mutações no mtDNA, o que resultou em mutações em várias proteínas mitocondriais, incluindo *Mitochondrial Ribosomal Protein S12* (mRpS12), ANT, citrato sintase e dYme1L. Mutações no mtDNA, podem afetar a bioenergética e a biogênese das mitocôndrias na regulação do SNC e neurogênese adulta, podendo ter impacto no transporte axonal anterógrado e retrógrado de mitocôndrias. Eventuais defeitos no transporte axonal, resultam em diminuição de suprimento de organelos e conseqüente anormalidades morfológicas nos axônios [45,46].

g) Comunicação intercelular alterada

Vários estudos mostraram que alterações na comunicação intercelular estão intimamente relacionadas à senescência. A comunicação celular desempenha um papel importante no processo de envelhecimento, regulando os níveis neuroendócrino, endócrino e neuronal. As sinalizações neuro-hormonais tendem a mediar o envelhecimento. Igualmente quando o ambiente inflamatório se exacerba há alterações na imunovigilância. A inflamação pode ser causada pelo aumento de secreção de citocinas pró-inflamatórias por células senescentes, além disso, a senescência celular influencia as células vizinhas através de contatos de junções comunicantes, fatores de crescimento, interleucinas e ROS [1,2,42,47].

Num estudo recente, Casadomé-Perales Á., *et al* (2023) [45], relata que a comunicação intercelular é alterada no cérebro envelhecido, onde é evidenciado que a sobrevivência neuronal é favorecida através da transferência de vesículas extracelulares (EV) derivadas de oligodendrócitos contendo Ceramida sintase 2 (CerS2) para neurónios. Foi mostrado que neurónios corticais envelhecidos incorporam CerS2 de EVs, por sua vez, favorecendo a resiliência neuronal a agentes de efeitos inflamatórios, como o fator de necrose tumoral α TNF- α . Foi demonstrado também que a inflamação associada à idade e o stresse metabólico favorecem a expressão de CerS2, que tem seu aumento dependente da idade. As EVs derivadas de oligodendrócitos carregados com CerS2 levam à expressão do fator antiapoptótico Bcl2 em condições inflamatórias.

h) Senescência Celular

A senescência celular é uma resposta celular complexa a uma variedade de agentes stressores, o que leva à perda gradual de sua capacidade de renovação e diferenciação. É um estado de paragem do ciclo celular, e como foi dito anteriormente, a principal característica do envelhecimento é a acumulação de células senescentes, o que acarretará a redução da

capacidade fisiológica cerebral [1,4]. Entretanto, o processo de senescência celular não se resume a uma simples perda de função celular e morte. As células senescentes possuem atividade, são resistentes à apoptose e o seu metabolismo está estritamente associado à regulação da autofagia [48]. As células senescentes param de se dividir e alteram sua atividade para fomentar a função secretora, o que leva à aquisição do fenótipo secretor associado a senescência (SASP), que em grande parte, resulta de um secretoma inflamatório, proteolítico e rico em fatores de crescimento, mediado pelo fator de transcrição, NF- κ B. O SASP define a secreção de diversas citocinas, quimiocinas, proteases, dentre outras moléculas, através das células senescentes [4].

O fenótipo SASP e os danos no DNA são os principais fatores que levam à senescência. Muitos fatores SASP causam o envelhecimento de células vizinhas. As vias de sinalização como, P16ink4a-pRb e p53-p21Cip1/Waf1-pRb, possuem papéis importantes na indução da senescência celular, o que fortalece a hipótese de que contribuem para o envelhecimento fisiológico (Figura 1) [48,49]. Pois a proteína p21, está diretamente envolvida na paragem do ciclo celular, onde interage com cinases dependentes de ciclinas (CdKs), o que poderá resultar na inibição da fosforilação de Rb, que, por sua vez, impedirá que a célula entre na fase S. Um dos principais mecanismos subjacentes à senescência celular é o aumento ROS e o stress oxidativo resultante, além de proporcionar o aumento da taxa de encurtamento dos telômeros, induzindo a atividade da beta-galactosidase associada à senescência (SA- β -Gal) (Figuras 1 e 2). Apesar de não totalmente específico, o aumento da atividade da SA- β -gal, é considerado o marcador mais sensível para senescência celular [6,25,50-54].

Relativamente à senescência neuronal, é válido dizer que a maioria dos neurónios maduros são mantidos por toda a vida e apresentam um alto potencial de plasticidade neuronal, o que favorece uma modulação e adaptação contínua da rede sináptica em resposta às alterações que ocorrem durante o processo de envelhecimento [53,55]. Estudos *in vivo* e *in vitro* identificaram marcadores de senescência neuronal, que abrangem as células que não possuem a capacidade de proliferação. Os neurónios são células pós-mitóticas (permanentemente na fase Go do ciclo celular), contudo, as características da senescência celular envolvem mais do que apenas a paragem irreversível da proliferação [56-59]. De acordo com Dong W., *et al* (2011) [56] e Geng Y.Q., *et al* (2010) [57], a SA- β -gal mostrou-se aumentada no hipocampo de ratos idosos em culturas *in vitro* de longa duração de neurónios hipocámpais e granulares cerebelares.

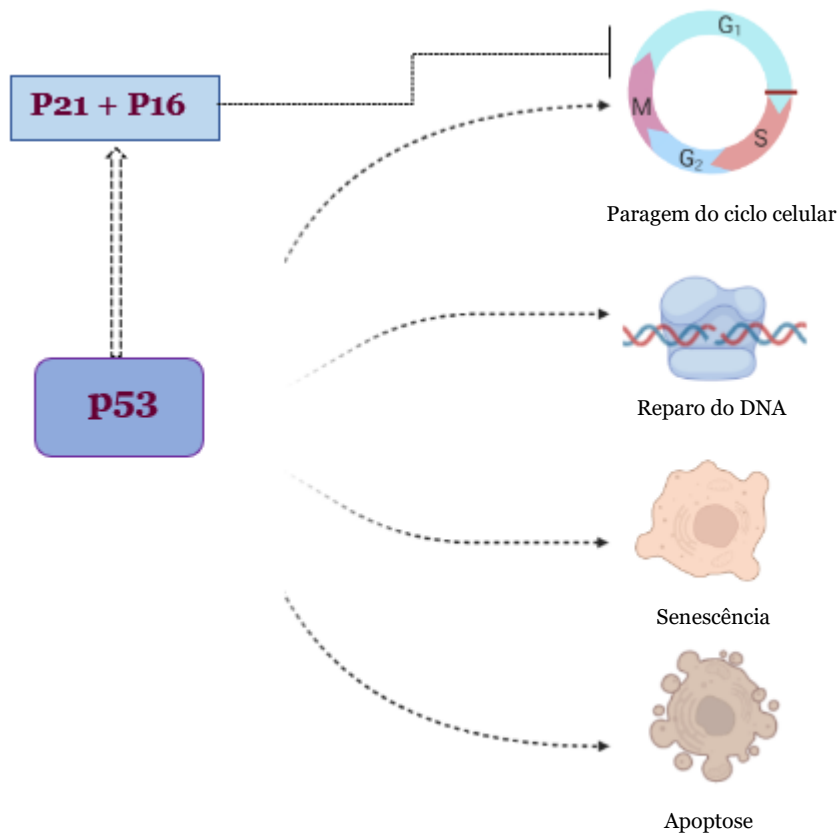


Figura 1. Mecanismo de controle do ciclo celular, reparação do DNA, senescência e apoptose. A proteína p53 possui um papel fundamental no controle do ciclo celular, sendo responsável principalmente pela verificação de cada *checkpoint*, reparação do DNA, apoptose e senescência celular. Através do controle da função das proteínas p16 e p21 por p53, a célula poderá avançar ou não para a duplicação do seu genoma. A família de proteínas a qual P16 faz parte, quando ativadas, inibem a fosforilação de pRb, impedindo o avanço para a fase S. A p21 ativada, impede a ligação das ciclinas com suas respectivas CdKs. Dessa forma, essas proteínas estão envolvidas diretamente no processo de senescência celular (criado com Biorender).

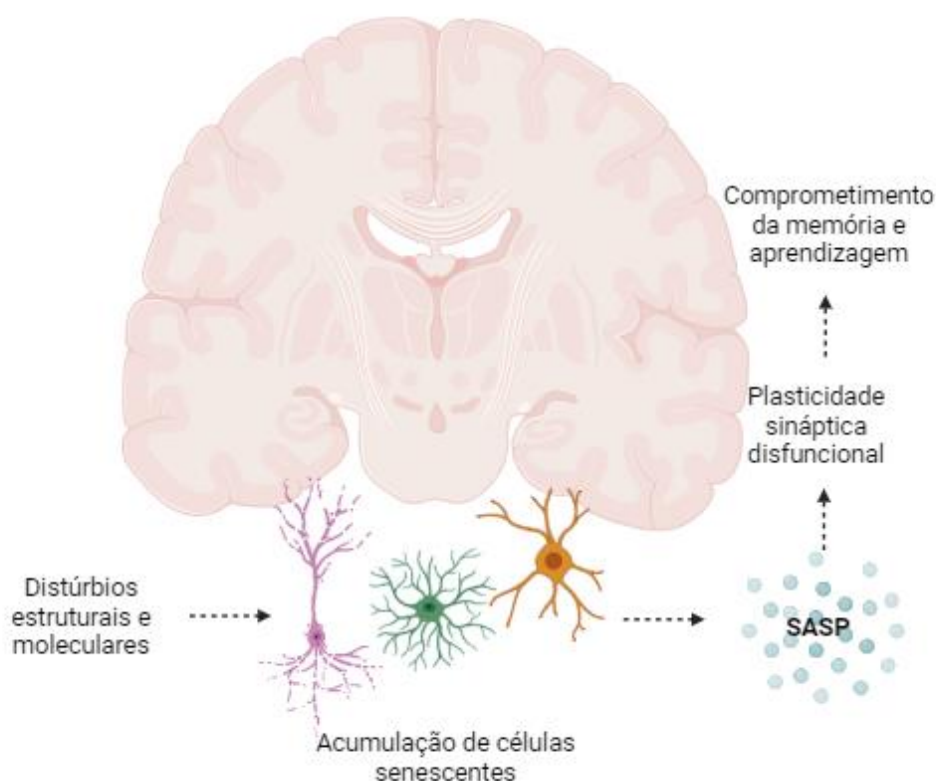


Figura 2. Acumulação de células senescentes e seus impactos no envelhecimento. Os fatores como, stress oxidativo, disfunção mitocondrial e metabolismo energético comprometido, podem induzir o fenótipo secretor associado à senescência (SASP). As células senescentes afetam as mudanças cerebrais relacionadas ao envelhecimento. A acumulação de células gliais e neurónios senescentes leva a alterações estruturais e funcionais no cérebro que resultam em comprometimento cognitivo (criado com Biorender).

Nos estudos de Ogrodnik M., *et al* (2021) [60], foram usadas duas estratégias para avaliar se a eliminação de células senescentes diminui a disfunção cognitiva durante o processo de envelhecimento; foram elas, a depuração farmacogenética de células senescentes p16Ink4 e o tratamento com os senolíticos Dasatinib e Quercetina. Foi demonstrado que a depuração de células senescentes melhora os fenótipos em modelos de murganhos com doenças neurodegenerativas. Foram utilizados murganhos jovens e idosos, e para todas as intervenções em murganhos idosos, a função cognitiva encontrava-se melhorada, os marcadores de senescência p16Ink4a, *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) e Laminina B1 (LMNB1) estavam diminuídos e ocorreu uma redução nos marcadores de inflamação associada à diminuição da ativação microglial e o número de células T residentes no cérebro. Essas mudanças não foram observadas em murganhos jovens expostos ao tratamento. Já o tratamento senolítico diminuiu a expressão de componentes SASP conhecidos e marcadores de inflamação, onde os efeitos foram relativamente residuais. É importante salientar que nem todas as células senescentes têm alta

expressão de p16Ink4a e nem todas as células com alta expressão de p16Ink4a são senescentes. Especula-se que a inflamação crônica decorrente da senescência pode influenciar negativamente a neurogênese e contribuir para a senescência nas células vizinhas, além de contribuir para a neurodegeneração (Figura 2). Durante o envelhecimento foi relatado que os marcadores de células senescentes aumentam em vários tipos de células, como neurónios, astrócitos, micróglia e células endoteliais [60-63].

1.1 Stress Oxidativo – Mecanismo subjacente à Senescência Celular

Na década de cinquenta, o investigador Denham Harman, propôs “A teoria dos radicais livres”, na qual essas moléculas oxidantes poderiam estar envolvidas no processo intrínseco de envelhecimento. Esta teoria é mais relevante para o SNC, já que o cérebro consome, em média, 20% do oxigênio corporal e os neurónios são células especialmente sensíveis e vulneráveis ao stresse oxidativo [64,65].

Um dos principais mecanismos subjacentes da senescência celular é o aumento de ROS intracelular. As ROS são moléculas instáveis contendo oxigênio e oxidantes, ou seja, uma molécula que remove elétrons de outras moléculas [66].

Existem fontes exógenas de ROS associadas ao estilo de vida e ambiente, como a poluição, exposição à luz ultravioleta, toxinas industriais, tabaco e radiação ionizante, entre outras. As fontes endógenas são os subprodutos gerados pelo metabolismo celular normal, sobretudo mitocondrial, a inflamação, como resposta imunitária e como segundos mensageiros nas vias de sinalização celular. As mitocôndrias são a fonte primária de ROS, produto da respiração celular, onde a redução do oxigênio molecular na cadeia de transporte de elétrons, tem como consequência a diminuição de radicais superóxidos, que são convertidos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por enzimas antioxidantes, como a catalase e a glutatona peroxidase. O peróxido de hidrogênio pode reagir com metais como o ferro (Fe²⁺) para produzir radicais hidroxil, altamente reativos capazes de reagir com os componentes das moléculas de DNA, bem como com lípidos (Figura 3) [66,67].

As consequências produzidas pelas ROS e a extensão do dano do stresse oxidativo resultante, depende da intensidade, duração e contexto da exposição. Em resposta ao stresse oxidativo, as células normalmente sofrem paragem do ciclo celular e entram na fase G₀ (estágio quiescente e sem divisão) devido a ativação da p21, que é regulada por p53, que por sua vez, interrompe a progressão do ciclo celular e impede que a célula entre na fase S (síntese de DNA). As ROS também podem desencadear a desfosforilação mediada por p53 e p21 e ativação da proteína supressora de tumor retinoblastoma (Rb), resultando na inibição da progressão do ciclo celular. Entretanto, a exposição crônica ou níveis muito altos de ROS podem resultar na ativação da via transcricional pró-inflamatória e iniciação da via de morte celular intrínseca, ou seja, indução de vias autofágicas ou apoptóticas [66,68].

No processo de envelhecimento e na disfunção mitocondrial decorrente de doenças neurodegenerativas, há a produção excessiva de ROS, que por sua vez, causam danos às proteínas e ao DNA, além de danificar outras células, pois quando as ROS são libertadas após a apoptose, causam distúrbios na neurotransmissão [69].

De acordo com os resultados de Santos S.S., *et al* (2022) [6], a indução da senescência nas CSNs foi atingida através do tratamento crônico utilizando um composto indutor de ROS, onde foi verificado também, uma redução significativa da proteína SIRT3, que possui função antioxidante. A paragem do crescimento associada à senescência demonstrou ser dependente da regulação mediada pelo stress oxidativo.

Conforme alguns estudos, há um conjunto de genes com expressão reduzida após os quarenta anos de idade, esses genes estão afetados no envelhecimento do cérebro humano, como exemplos, os genes da autofagia ATG5, ATG7 e BECN1 [70]. Há também a expressão significativamente reduzida de vários receptores de neurotransmissores que possuem um papel crucial na plasticidade sináptica como a subunidade do receptor 1 do glutamato (GluR1), ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), Nmetil-D-aspartato (NMDA), a subunidade do receptor R2A e as subunidades do receptor ácido gama-aminobutírico (GABA) [53,70]. Grande parte dos genes regulados pela idade mostrou dano oxidativo ao DNA significativamente maior no cérebro envelhecido [18,53,71-73].

Segundo Schmeer K., *et al* (2019) [7], o envelhecimento surge da acumulação aleatória de vários biomarcadores e processos moleculares dependentes da idade, como alguns eventos genéticos adulterados e o stress oxidativo que, em conjunto, podem promover a degeneração celular.

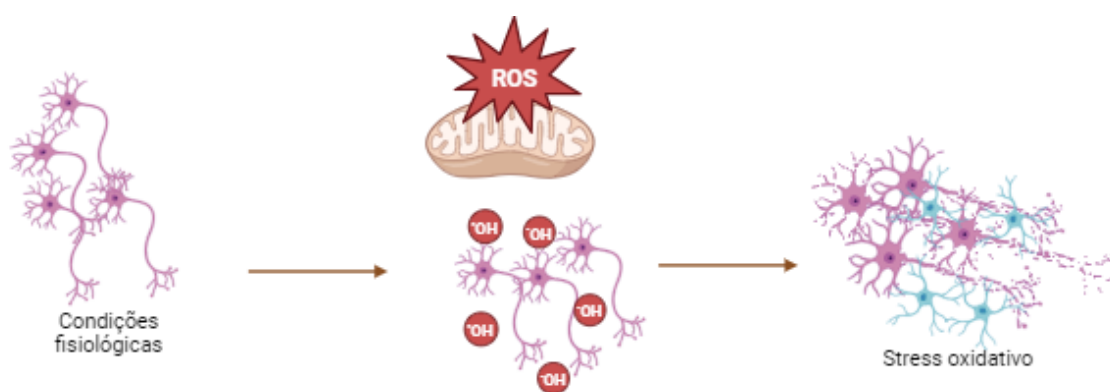


Figura 3. Representação do mecanismo de stress oxidativo em células neuronais. Um dos principais mecanismos subjacentes da senescência celular é o aumento de ROS e o stress oxidativo resultante. As ROS são moléculas instáveis contendo oxigênio, oxidantes. As mitocôndrias são a fonte primária de ROS, produto da respiração celular. Em resposta ao estresse oxidativo, as células normalmente sofrem paragem do ciclo celular e entram na fase G₀ (estágio quiescente e sem divisão) devido à ativação da p21, que é

regulada por p53, que por sua vez, interrompe a progressão do ciclo celular e impede que a célula entre na fase S (síntese de DNA) (criado com Biorender).

1.2 Modelos animais de envelhecimento

Atualmente, os estudos acerca do processo de envelhecimento concordam, cada vez mais que o envelhecimento deriva de um conjunto complexo de fatores. Relativamente à componente cerebral, o envelhecimento é acompanhado pela progressiva deficiência funcional e cognitiva, resultando na disfunção cerebral, que por sua vez, contribui e se manifesta através do desenvolvimento de várias doenças associadas à idade, as neurodegenerativas. Estudos recentes mostram que estas doenças, que são diagnosticadas e tratadas de formas diferentes, podem ter em comum uma ou mais causas associadas ao envelhecimento [72-75].

A validação de um modelo animal é um importante recurso para o estudo do envelhecimento, pois nem todos os animais perdem a integridade de seus tecidos ao longo do tempo. Desta forma, é imprescindível que o modelo animal utilizado tenha as características mais semelhantes e vantajosas possíveis para que se possa obter uma correlação mais próxima do ser humano [72,75,76].

Para a escolha de um modelo animal de envelhecimento, é necessário respeitar alguns critérios como: a) os fenótipos de envelhecimento deverão ser passíveis de quantificar e os seus mecanismos intrínsecos devem ser semelhantes aos dos seres humanos; b) preferencialmente, os modelos manipulados em laboratório sejam reprodutíveis e de fácil manipulação (animais de pequeno porte e baixo custo para garantir uma quantidade considerável); c) usar organismos que não sejam sencientes [72,75].

É de suma importância ao selecionar um modelo ideal de envelhecimento, identificar os aspectos que se quer analisar, é necessário perceber se os aspectos escolhidos para serem estudados conseguem ser reproduzidos e se mimetizam fidedignamente estas condições. Conforme alguns estudos, o modelo animal mais vantajoso para investigação acerca do envelhecimento cerebral seria o de roedores, pois apresentam semelhanças fisiológicas e celulares com os humanos, e em menor escala, em sua anatomia [72,75]. Em particular, os murganhos, são considerados um modelo apropriado devido à facilidade de manipular geneticamente o seu genoma, de se reproduzirem e têm-se conhecimento de uma grande quantidade de dados fenotípicos, além da possibilidade de seus tecidos serem analisados em todas as fases do processo de envelhecimento [75]. Porém, existem algumas diferenças, que até certo ponto, podem ser consideradas limitações desse modelo, já que nos murganhos os telómeros são longos e a atividade da telomerase é presente em vários órgãos, o que diverge dos humanos [72,75,77]. Os murganhos podem sintetizar algumas vitaminas, como a vitamina C, que influencia diretamente certos processos de envelhecimento. No que diz respeito às doenças

relacionadas à idade, os murganhos envelhecidos não apresentam todas as doenças típicas dos humanos no decorrer do seu tempo de vida [72,75,77,78]. Os modelos animais de envelhecimento mais comumente usados atualmente são *in vivo* e *in vitro*. Em modelos *in vitro*, apesar de amplamente utilizados, não reproduzem efetivamente as interações célula – a – célula, nem célula - matriz extracelular. Em modelos *in vivo*, exige o uso de animais transgênicos, além de ser um modelo de alto custo e grande complexidade. A exemplo de estudos que fizeram uso de animais transgênicos, Ogrodnik M., *et al* (2021) [60], utilizaram murganhos transgênicos INK-ATTAC, nos quais a apoptose de células com alta expressão de p16Ink4a pode ser induzida após administração da poliamina natural espermidina e espermina. Xu T.T., *et al* (2020) [79], utilizaram murganhos machos 8 (SAMP8) com tendência à senescência acelerada e murganhos SAMR1 resistentes a senescência acelerada para demonstrar que a administração prolongada de poliaminas, espermidina e espermina, retarda o envelhecimento cerebral e melhora a disfunção cognitiva nos animais SAMP8.

1.3 Modelo animal *ex vivo*

Culturas organotípicas de fatias de cérebro são explantes de tecidos de regiões do SNC de roedores ou humanos, que podem ser mantidas *ex vivo* por várias semanas. Essas culturas representam modelos de complexidade intermediária entre culturas de células *in vitro* e modelos pré-clínicos *in vivo*. Uma das principais vantagens das culturas de fatias organotípicas é a presença dos vários tipos de células cerebrais (neurónios, microglia, astrócitos, oligodendrócitos, CSNs e células endoteliais) cultivados em molde 3D, e, assim, replicam a maioria das condições *in vivo* [80,81]. Contudo, atualmente, não existem estudos em que fatias de hipocampo de roedores tenham sido utilizadas como modelo experimental *ex vivo* de envelhecimento cerebral

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um novo modelo experimental de envelhecimento cerebral em fatias organotípicas de hipocampo, e assim potencializar a descoberta dos mecanismos associados e, eventualmente, de fatores de risco inerentes às doenças neurodegenerativas.

Para estabelecer um modelo de envelhecimento em culturas organotípicas de hipocampo, utilizamos o composto terc-butil hidroperóxido (t-BHP). Este composto é um análogo do hidroperóxido reativo e um indutor de stress oxidativo e dano celular. O seu mecanismo de ação incide, em parte, na depleção da glutathione (que tem ação antioxidante), resultando no esgotamento do potencial antioxidante das células, produção de radicais livres, iniciando assim, a peroxidação lipídica que reduzirá o potencial de membrana mitocondrial em células neuronais [6]. Esse processo induz a senescência celular prematura em vários tipos de células, o que levará ao aumento da taxa de encurtamento dos telômeros e promoverá a atividade da beta-galactosidase associada à senescência (SA- β -Gal). Este composto usado como aditivo em frutos

do mar congelados, lubrificantes, branqueadores e desinfetantes, pode desencadear radicais peróxido e alcóxido e produzir ROS do tipo hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e, assim, aumentar a permeabilidade membranar e danificar as células reagindo com DNA, proteínas e lipídios. O t-BHP induz também lesões celulares em células astrogliais de ratos, células endoteliais cerebrais de murganços, e é um indutor de senescência [6,21,48].



Figura 4. Representação dos níveis de ROS aumentados frente aos mecanismos oxidantes. As ROS em níveis baixos a moderados desempenham um papel importante nos processos celulares normais, como a regulação das funções fisiológicas, mas, se a exposição for elevada ou crônica, podem ser oxidantes poderosos e prejudiciais para a célula. O composto t-BHP é um análogo do hidroperóxido reativo e um indutor de stress oxidativo e dano celular. O seu mecanismo de ação caracteriza-se, em parte, através da depleção da glutathione (que tem ação antioxidante), portanto, esgota o potencial antioxidante das células para produzir radicais livres (criado com Biorender).

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi implementar um novo modelo *ex vivo* de envelhecimento cerebral utilizando t-BHP em culturas organotípicas de hipocampo de murganhos. Atualmente, os modelos de envelhecimento existentes na literatura são *in vivo* e *in vitro*, o que torna relevante estabelecer um novo modelo de envelhecimento cerebral de complexidade intermédia e de fácil manutenção. O estabelecimento deste tipo de modelo *ex vivo*, poderá ser crucial nas diversas questões ainda não totalmente compreendidas sobre os mecanismos moleculares do envelhecimento e, possibilitará também, o desenvolvimento de terapias para patologias associadas ao envelhecimento cerebral.

Para isso, foram utilizadas culturas organotípicas de fatias de hipocampo de murganhos neonatais, posteriormente expostas ao composto terc-butil hidroperóxido (t-BHP), com os objetivos de:

- Induzir a senescência celular através do tratamento sub-crónico com t-BHP.
- Avaliar a indução do stress oxidativo, assim como, a atividade neuronal e sobrevivência celular através de marcadores moleculares e ensaios de viabilidade celular.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

1. Animais

Neste trabalho, foram utilizados murganhos da estirpe C57BL/6 com seis a nove dias de idade. Todas as experiências foram realizadas de acordo com a Directiva 2010/63/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de setembro de 2010 relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos e a lei (DL n 113/2013) para o cuidado e uso de animais de laboratório com a aprovação do protocolo de experimentação animal pelo Órgão de Bem-Estar e Ética Animal (ORBEA) do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI). Todos os esforços foram efetuados para minimizar o número de animais utilizados e o seu sofrimento, de acordo com os princípios dos 3R's.

2. Culturas organotípicas de fatias de hipocampo

Todos os procedimentos realizados para as culturas organotípicas de fatias de hipocampo foram realizados em condições assépticas. Inicialmente, procedeu-se à extração de cérebros de murganhos C57BL/6J com 6 a 9 dias de idade. Após a decapitação, foi removido o crânio, extraído o cérebro e, seguidamente, os dois hipocampos foram dissecados e seccionados em fatias coronais de 350 µm de espessura, utilizando o seccionador de tecidos McIlwain Tissue Chopper. As fatias de hipocampo foram colocadas em solução salina Gey's (Sigma-Aldrich) suplementado com 25mM de D-glicose (Merck) e, seguidamente, colocadas em membranas porosas com filtro de 0.4 micrómetros (Millicell PICMO3050). Foram colocadas 6 fatias de hipocampo por insert, o qual foi posteriormente transferido para uma placa de cultura de 6 poços (Corning Costar) (Figura 5). Cada poço continha 1 mL meio de cultura, constituído por 50% de meio Opti-MEM I Medium (Gibco), 25% de soro de cavalo inativado pelo calor (Invitrogen) e 25% de solução salina Hank (HBSS, Gibco) suplementado com 25mM de D-glicose e 1mM antibiótico penicilina-streptomina (Thermo Scientific). As placas de cultura foram colocadas numa incubadora de células com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, a 37°C. O meio foi renovado duas vezes por semana, durante 2 semanas. Antes de iniciar a incubação com o t-BHP, o meio de cultura foi substituído por 1 mL de meio Neurobasal Medium (Gibco) isento de soro, 1mM L-glutamina (Thermo Scientific), Suplemento B27 (50x) (Gibco) e antibiótico

penicilina-streptomicina (10,000 U/mL penicilina e 10,000 µg/mL streptomicina) (Thermo Scientific) [82,83].

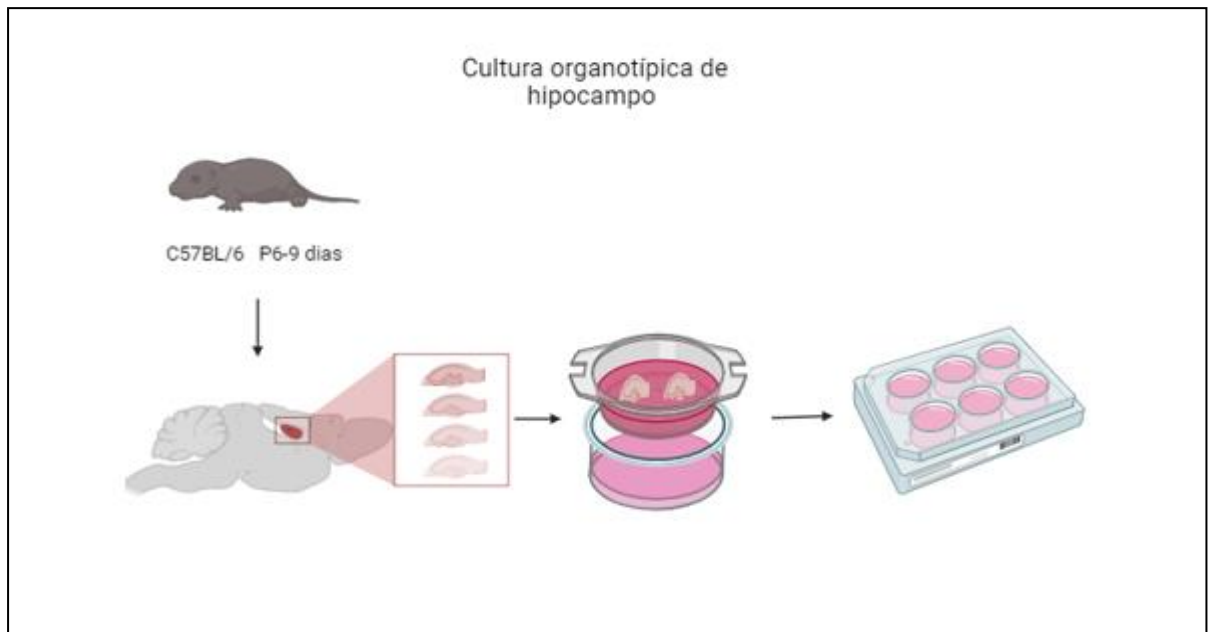


Figura 5. Esquema ilustrativo do procedimento experimental para a realização de culturas organotípicas de hipocampo de murganhos. Na primeira etapa, ocorre a extração de cérebros de murganhos C57BL/6J com 6 a 9 dias de idade. Os dois hipocampus são dissecados e seccionados em fatias coronais de 350 µm de espessura e colocadas 6 fatias de hipocampo em membranas porosas (inserts), posteriormente transferidas para uma placa de cultura de 6 poços em meio Opti-MEM I (criado com Biorender).

3. Indução da senescência

Para induzir senescência, as fatias organotípicas de hipocampo foram incubadas com as concentrações de 10µM e 25µM de terc-Butil hidroperóxido (t-BHP, Sigma Aldrich). Após 2 horas de incubação com t-BHP, as fatias foram lavadas duas vezes com meio Neurobasal e, posteriormente, incubadas em meio Neurobasal durante 22 horas para recuperação. Este procedimento experimental foi repetido durante 3 dias consecutivos (D1 – D3) [81,82] (Figura 6).

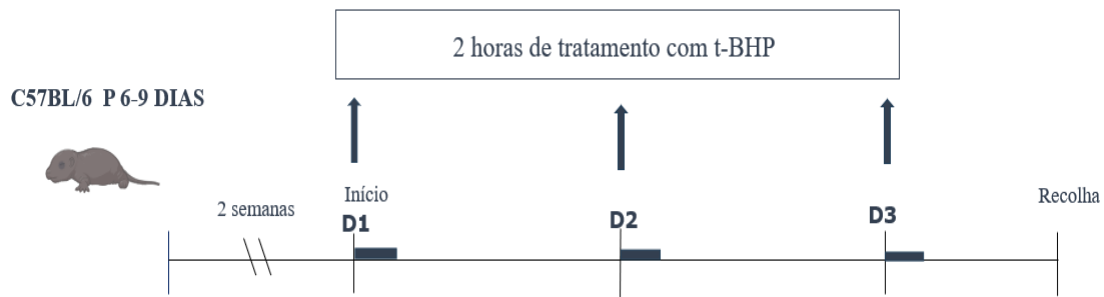


Figura 6. Paradigma experimental para estabelecer o modelo de envelhecimento induzido pelo composto t-BHP em fatias organotípicas de hipocampo de murganhos C57BL/6J de 14 dias em cultura.

4. Determinação de viabilidade celular pelo ensaio de LDH

Para avaliar a citotoxicidade ou morte celular após exposição ao t-BHP, foi utilizado o ensaio de citotoxicidade não radioativa CytoTox 96® (Promega G1780). O protocolo foi adaptado às culturas de fatias organotípicas de hipocampo. Este ensaio mede quantitativamente a função da enzima lactato desidrogenase (LDH), que possui cinco isoformas, e estão presentes em diferentes tipos de tecidos, das quais diferem em quantidade, especificidade e cinética da ação enzimática. Todas as isoformas da LDH catalisam a reação comum de interconversão de piruvato em lactato, acompanhada pela oxidação de NADH a NAD⁺. O ensaio de libertação total de LDH fornece uma medida da atividade da LDH quando as células são lisadas e libertam o LDH presente no seu interior. Sendo a LDH uma enzima citosólica, encontrada em todas as células, ela é libertada para o meio de cultura quando a membrana plasmática é danificada, uma característica das células que sofrem algum tipo de dano celular (necrose e/ou apoptose tardia) [20,82].

Os meios de cultura em que as fatias estavam inseridas foram usados como amostras (50µL). Depois foram adicionados 50µL da solução mix (reagente do kit) e incubados em uma placa de 96 poços durante 30 minutos, a temperatura ambiente e protegida da luz. No final da incubação, foi adicionada uma solução de paragem em todos os poços. A LDH libertada nos sobrenadantes das culturas é medida através de um ensaio enzimático, em que o reagente é adicionado em todos os poços do ensaio o que resulta na conversão de um sal de tetrazólio (iodonitrotetrazólio violeta; INT) em um produto formazano vermelho. A quantidade de formazano é diretamente proporcional à quantidade de LDH em cultura, que por sua vez é diretamente proporcional ao número de células mortas ou danificadas. O sinal de absorvância é medido em 490nm num leitor de placas de 96 poços padrão. Para a normalização do ensaio, foi quantificada a quantidade total de proteína nas fatias [83,84].

5. Determinação da senescência celular pelo ensaio da β -galactosidase

A atividade da β -galactosidase é um biomarcador de senescência celular amplamente utilizado. A atividade de SA- β -gal resulta de uma expressão aumentada de Galactosidase beta 1 (GLB-1), o gene que codifica a beta-galactosidase lisossômica (β -gal). O aumento da expressão desse gene e dos níveis de proteína resulta da elevação do número e da atividade dos lisossomas, provavelmente pela acumulação de macromoléculas danificadas nas células senescentes. Portanto, foi efetuado o ensaio da β -galactosidase, o qual foi adaptado para as culturas organotípicas, como indicação de senescência celular. As fatias de hipocampo foram fixadas em solução fixadora (do kit Senescence Detection, Abcam - ab65351 – composição: formaldeído e glutaraldeído) ou PFA 4% e incubadas *overnight*. Após a incubação, foram feitas lavagens com PBS e as fatias foram transferidas para uma placa de 24 poços, onde foi adicionado um mix de soluções (solução de coloração SDS 1x - ácido 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxílico; suplemento de coloração SDS 100x – Ferrocianeto de potássio) e a enzima (SDS X-Gal - 2S,3R,4S,5R,6R) -2-[(5-bromo-4-cloro-1H-indol-3-il)oxi]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol (150 mg, liofilizado)) em cada poço. De seguida, a placa protegida da luz e dos níveis de CO₂ da incubadora (os níveis de CO₂ encontrados em incubadoras de 37°C podem diminuir o pH da solução de coloração, afetando o desenvolvimento da cor, por isso, a placa é colocada dentro de um saco Ziplock®) foi incubada a 37°C por 3 horas. Após a incubação, as fatias foram transferidas para lâminas para montagem e observadas ao microscópio, na objetiva 40x, quanto à presença de células com coloração azul [90]. De seguida efetuou-se a análise quantitativa da intensidade e área ocupada pela coloração, utilizando 1 fatia para cada condição, onde foram selecionados 5 campos, os quais foram quantificados de acordo com a percentagem da intensidade do sinal por campo, sob a ampliação de 40× no microscópio AxioImager (Carl Zeiss).

6. Western blot

6.1 Extração e quantificação proteica

Para se proceder à extração proteica, as fatias organotípicas de cada insert foram dissociadas mecanicamente, em 40µL de tampão RIPA (50 mM Tris-Base, pH=8,0; 150mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% desoxicolato de sódio; 0,1% SDS), contendo inibidores de protease (Sigma-Aldrich P8340). As amostras em tampão de RIPA foram sonicadas durante 10 minutos. De seguida, procedeu-se à centrifugação do tecido, com a força centrífuga de 12.000g, durante 20 minutos, a 4°C, para obtenção da fração da proteína solúvel, o sobrenadante. Seguidamente foi utilizado o kit de ensaio de proteína de ácido bicinonínico – BCA (Thermo Scientific) adicionando o volume necessário em cada poço de uma placa de 96 poços e posteriormente medida a absorvância a 570nm.

6.2 Immunoblot

A análise da expressão proteica foi realizada para avaliação da expressão de Superóxido Dismutase 2 SOD2 (um marcador de stress oxidativo), NeuN (marcador de neurónios maduros) e DCX (Doublecortin, marcador de neurónios precursores). Para a preparação dos géis de poliacrilamida 12%, foi preparado inicialmente o gel Resolving, com água destilada; 1,5M Tris (pH 8.8); 40% de acrilamida; 10% SDS; 10% APS e TEMED. De seguida, foi realizada a preparação do gel Stacking, com água destilada; 1,0M Tris (pH 6.8); 40% de acrilamida; 10% SDS; 10% APS e TEMED. Em cada poço (lane) foi carregado 30 µg de proteína total, separadas em géis de poliacrilamida 12% SDS, em solução tampão de corrida 25mM Tris, 190mM de glicina e SDS 0,1%; pH=8,3 por SDS-PAGE eletroforese a 110 V por 90 minutos. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham™ Hybond™) usando uma corrente elétrica de 110 V, 75mA, por 90 minutos, em gelo em tampão de transferência 25mM de Tris, 190mM de glicina, 20% de Metanol, pH = 8,3. Em seguida, as membranas foram bloqueadas em tampão salino Tris (TBS-T) suplementado com 5% de leite em pó ou 5% BSA para o anticorpo primário durante 60 minutos à temperatura ambiente. De seguida, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: anti-SOD2 de coelho (1:5000; NOVUSBio), anti-NeuN de rato (1:1500; Millipore) e anti-doublecortin (DCX) de cabra (1:500; Santa Cruz) durante a noite, a 4°C. Após três lavagens com TBS-T, as membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários: anti-rabbit (1:5000; Santa Cruz), anti-mouse (1:5000; Santa Cruz) e anti-goat (1:5000; Santa Cruz), por 90 minutos, à temperatura ambiente. Para normalizar a expressão da proteína alvo, as membranas foram incubadas com o anticorpo anti-GAPDH de rato (1:5000; Millipore) por 90 minutos e o correspondente anticorpo secundário anti-mouse (1:5000; Santa Cruz) por 60 minutos, ambos a temperatura ambiente. Finalmente, as membranas foram expostas a 1mL de Clarity Western ECL Subs (BioRad), onde os níveis de fluorescência foram detectados pelo ChemiDoc™ MP e para a quantificação das proteínas foi usado o software ImageLab (Laboratórios Bio-Rad).

7. Análise de dados

A análise de dados foi feita usando o software GraphPad Prism 8.0, usando ANOVA de uma via seguida de o teste de comparações múltiplas de Dunnett. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos e os dados são mostrados como a média \pm erro padrão da média (SEM).

Capítulo 4

Resultados

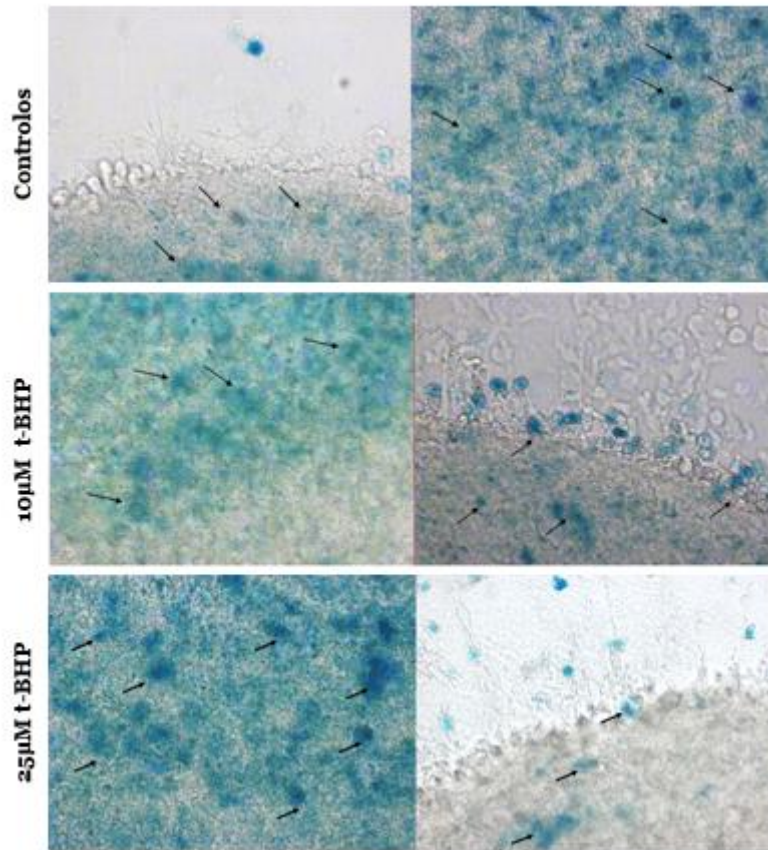
1. Efeito do tratamento com t-BHP na indução da senescência celular

As células produzem vários tipos de ROS. As principais fontes endógenas de ROS incluem os complexos mitocondriais da cadeia transportadora de elétrons. Sob condições fisiológicas, as células mantêm baixas concentrações intracelulares de ROS. A sinalização anormal das mitocôndrias envolve mensageiros, dos quais, o mais importante é ROS. Além de ser obtido pela cadeia transportadora de elétrons, também pode ser libertado pelo mtDNA, após o mesmo sofrer reações prejudiciais de OXPHOS. Durante a senescência, esta resposta é exacerbada e o stress oxidativo acaba por ser um estímulo ao desenvolvimento de fenótipos senescentes. As células senescentes exibem aumento do tamanho celular e da expressão associada à senescência da atividade da β -galactosidase [85-89].

Para induzir a senescência foi utilizado o composto t-BHP, cuja ação dá-se, em parte, através da redução da glutatona, portanto, esgota o potencial antioxidante das células, produzindo radicais livres, que por sua vez, iniciam a peroxidação lipídica e reduzem o potencial de membrana mitocondrial, induzindo a senescência celular [6,21,48].

De acordo com os resultados obtidos através do ensaio da β -galactosidase, verificou-se que o t-BHP, a ambas as concentrações testadas (10 μ M e 25 μ M), não induziu um aumento da intensidade de coloração azul, indicador de células senescentes, comparativamente com as culturas controle. Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM (controle: 100.0 \pm 1.5%; n=4; 10 μ M t-BHP: 98.4 \pm 0.7%; n=3; 25 μ M t-BHP: 101.8 \pm 1.4%; n=3). A variabilidade dos resultados entre as amostras nas três condições é quase inexistente (Figura 7).

A



B

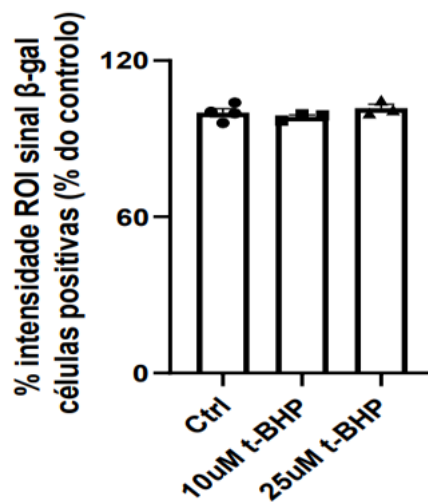


Figura 7. Campos de fatias de hipocampo com coloração de SA-β-galactosidase e níveis de expressão de β-galactosidase. O tratamento com t-BHP em fatias de hipocampo não foi capaz de induzir senescência. (A) Imagens representativas das fatias controlo (sem tratamento), fatias tratadas com concentração de 10µM e fatias tratadas com concentração de 25µM t-BHP. As células foram visualizadas usando microscopia de

contraste de fase (ampliação de 40x). As setas indicam coloração azul positiva para SA- β -galactosidase. (B) Análise quantitativa da intensidade do sinal da coloração em células positivas para SA- β -galactosidase. Gráfico do ensaio β -galactosidase para as concentrações de 10 μ M e 25 μ M t-BHP e o controlo sem tratamento. Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM. O controlo foi normalizado para 100%. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA unidirecional, seguida pelo Teste de comparação múltipla de Dunnett.

2. Efeito do tratamento com t-BHP na viabilidade celular

O ensaio de LDH foi utilizado para detectar a citotoxicidade induzida através do tratamento com t-BHP, nas concentrações de 10 μ M e 25 μ M em fatias de hipocampo. Verificou-se um aumento significativo de intensidade de coloração nas fatias tratadas com concentração de 25 μ M, enquanto a concentração de 10 μ M não induziu diferenças significativas comparativamente com o controlo. Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM (controlo: 100.0 \pm 9.7%; n=5; 10 μ M t-BHP: 51.4 \pm 6.3%; n=4; 25 μ M t-BHP: 401.7 \pm 65.7%; n=5) (Figura 8).

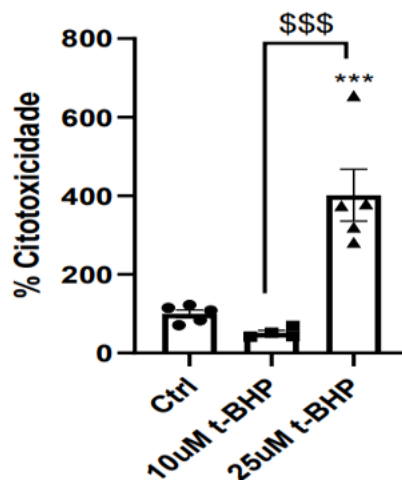


Figura 8. Citotoxicidade induzida por t-BHP em fatias de hipocampo – Ensaio LDH. O tratamento com 25 μ t-BHP em fatias de hipocampo induziu morte celular. Não há diferenças significativas entre as fatias tratadas com a concentração 10 μ M e o controlo (não tratado). Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM. O controlo foi normalizado para 100%. Na análise de dados usou-se ANOVA unidirecional, seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnett ***P<0,01 em relação ao controlo e \$\$\$P<0,01 em relação à concentração de 10 μ M.

3. Efeito do tratamento com t-BHP no stress oxidativo

Para avaliar os efeitos do t-BHP na indução do stress oxidativo nas fatias de hipocampo, foi analisada a expressão de SOD2 por Western blot. Trata-se de uma enzima que está entre os mais

importantes sistemas de defesa contra os radicais de oxigênio e é um marcador de stress oxidativo [90].

Verificou-se uma tendência de aumento da expressão de SOD2 nas fatias expostas às duas concentrações de t-BHP (10 μ M e 25 μ M) em relação ao controle, porém, a maior expressão de SOD2 foi verificada na concentração de 25 μ M, o que sugere uma tendência do sistema a responder ao estímulo oxidativo. Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM (controle: 100.0 \pm 8.8%; n=4; 10 μ M t-BHP: 216.1 \pm 41.2%; n=6; 25 μ M t-BHP: 723.2 \pm 434.8%; n=2) (Figura 9).

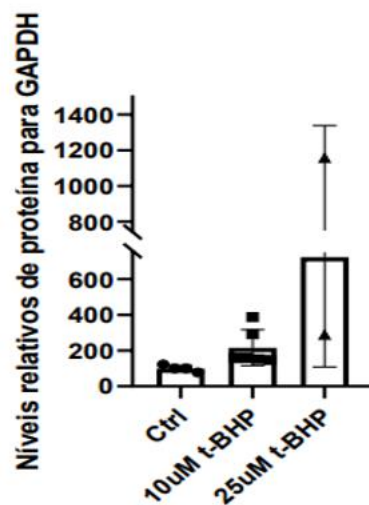


Figura 9. Níveis de expressão de SOD2. O tratamento com t-BHP em fatias de hipocampo sugere uma tendência de aumento da expressão de SOD2. O gráfico mostra uma tendência de aumento da expressão de SOD2 na concentração de 25 μ M em relação às fatias controle, enquanto as fatias tratadas com concentração de 10 μ M apresentaram uma tendência de aumento menos expressiva. A expressão protéica foi normalizada para GAPDH. Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM. A expressão de SOD2 nos controles foi normalizada para 100%. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA unidirecional, seguida pelo Teste de comparação múltipla de Dunnett.

4. Efeito do tratamento com t-BHP na sobrevivência neuronal

O stress oxidativo está envolvido na predisposição à morte de neurónios, direta ou indiretamente, como consequência da disfunção mitocondrial, da agregação de proteínas, do metabolismo de neurotransmissores, inflamação e desregulação das vias antioxidantes. O cérebro é particularmente suscetível ao stress oxidativo, pois requer um alto consumo de oxigênio, é dependente da atividade mitocondrial e sua defesa antioxidante endógena é relativamente fraca, entre outros motivos. Como dito anteriormente, as ROS causam dano

oxidativo a proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, comprometendo as funções celulares críticas e ativando vias de morte celular (Figura 4) [91-100].

Para avaliar os efeitos do tratamento com t-BHP na sobrevivência e atividade neuronal, foram efetuados western-blot para quantificar a expressão proteica dos marcadores neuronais NeuN e DCX. Relativamente às análises com estes marcadores, observa-se que o tratamento com t-BHP, na concentração de 10 μ M, não induziu alterações significativas, para nenhum destes marcadores neuronais, em relação às fatias controlo. A concentração de 25 μ M t-BHP induziu uma tendência de aumento da expressão de NeuN, mas, em contrapartida, induziu a diminuição da expressão de DCX, o que sugere uma tendência para diminuição de neurónios precursores [101] (Figura 10) (NeuN: controlo: 100.0 \pm 6.4%; n=3; 10 μ M t-BHP: 83.1 \pm 7.6%; n=4; 25 μ M t-BHP: 327.2. \pm 208.7%; n=2. DCX: controlo: 100.0 \pm 0.0%; n=1; 10 μ M t-BHP: 109.3 \pm 14.9%; n=2; 25 μ M t-BHP: 56.2 \pm 33.4%; n=2). Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM.

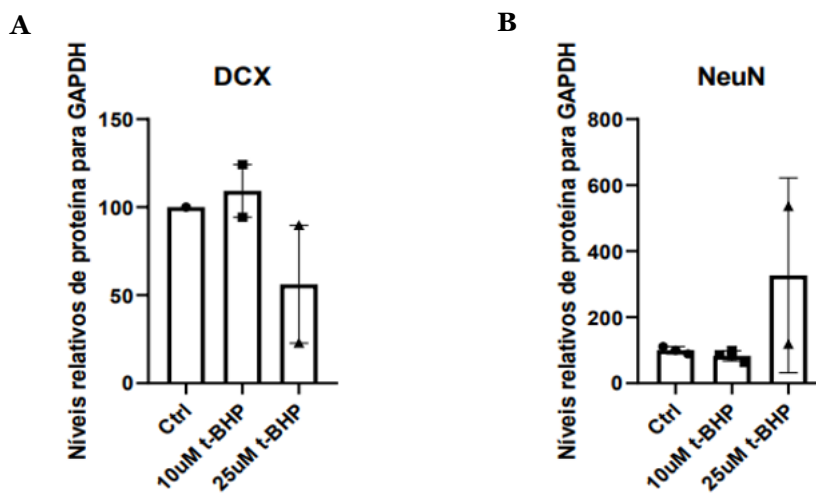


Figura 10. Níveis de expressão de NeuN e DCX. O tratamento com t-BHP em fatias de hipocampo não comprometeu a sobrevivência neuronal. (A) Níveis de expressão de NeuN marcador de neurónios maduros. A expressão proteica foi normalizada para GAPDH. Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM. A expressão de NeuN nos controlos foi normalizada para 100%. (B) DCX, marcador de precursor neuronal. A expressão proteica foi normalizada para GAPDH. Os dados são expressos como percentagem da média \pm SEM. A expressão de DCX foi normalizada para 100%. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA unidirecional, seguida pelo Teste de comparação múltipla de Dunnett.

Capítulo 5

Discussão

No presente estudo, o composto t-BHP, um indutor de stress oxidativo, amplamente utilizado em estudos *in vitro* e *in vivo* (em vários tipos celulares), foi o estímulo designado para estabelecer um novo modelo *ex vivo* de envelhecimento cerebral em fatias organotípicas de hipocampo. O t-BHP induz o aumento da produção de ROS através da peroxidação lipídica, danificando as membranas celulares, promovendo a perda do seu potencial de membrana, reduzindo o sistema de defesa antioxidante mitocondrial, podendo ocasionar danos ao DNA, que por sua vez, pode conduzir à ativação da via de sinalização p53, responsável por regular o processo de inibição do ciclo celular, senescência e apoptose. A senescência induzida pelo t-BHP através do stress oxidativo, está implicada como um dos principais mecanismos responsáveis pelo processo de envelhecimento [6,11,48,102-105].

Devido à fragilidade das fatias das culturas organotípicas obtidas (apesar de serem culturas de longo prazo), foi necessário ajustar as concentrações e o período de tratamento com o t-BHP, evitando assim, a degradação das amostras e preservando a qualidade dos resultados. Com base na literatura, realizamos o ajuste de concentrações e tempos de incubação. Alguns exemplos de trabalhos que utilizaram outras concentrações de t-BHP e tempos de incubação, podemos citar o trabalho de Yao Y., *et al* (2018) [25], onde foi usada a concentração de 100µM t-BHP, durante 2 horas em CSNs do hipocampo de ratos recém-nascidos. Este tratamento induziu diminuição da viabilidade celular nas CSNs em 37,28% no grupo t-BHP, níveis significativamente mais baixos de células em proliferação positivas para Ki67 e aumento da percentagem de células positivas para SA-b-gal.

No estudo de Huang C., *et al* (2019) [69], foram testadas as concentrações de 2,5µM, 5µM, 10µM, 15µM e 20µM de t-BHP durante 24 horas em culturas primárias de neurónios cerebrocorticais de murganhos recém-nascidos. O ensaio de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) foi utilizado para determinar o nível de ROS intracelular. Os resultados revelaram que o t-BHP reduziu a viabilidade celular dependente da dose e que a exposição à concentração de 10µM t-BHP, diminuiu a viabilidade celular em aproximadamente 50% e induziu stress oxidativo para 250% em relação ao controlo.

Nos estudos de Rabin D.M., *et al* (2013) [106], foi usada a concentração de 500µM por 2h durante 5 dias, em células hRPE (células do epitélio pigmentar da retina humana) em que se verificaram mudanças na expressão de transcritos na Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI), assim, demonstraram que o tratamento com t-BHP durante 5 dias foi significativamente mais eficaz do que o tratamento de 1 dia na indução destes efeitos sobre as células hRPE.

No nosso estudo, o stress oxidativo foi induzido nas fatias de hipocampo de murganhos com 6 a 9 dias de idade por exposição sequencial de curto prazo ao agente oxidante t-BHP, 2h por dia, durante três dias. Após tratamento com a concentração de 25µM t-BHP foi observado um aumento de expressão do marcador de stress oxidativo, SOD2, o qual é recrutado para eliminação de superóxido nas células, sugerindo uma resposta compensatória, em que o stress oxidativo pode levar ao aumento da expressão de SOD2, uma vez que, o stress oxidativo é uma consequência do uso de oxigênio na respiração aeróbia, onde há um persistente desequilíbrio entre a geração de ROS e a capacidade do sistema antioxidante endógeno em neutralizar a geração de ROS excessiva. Esse sistema antioxidante endógeno é composto por componentes capazes de eliminar ROS e proteger as células dos seus efeitos deletérios, como SOD2, catalase, entre outras [107].

De acordo com Moldogazieva, N.T., *et al* (2019) [107], um nível reduzido de ROS pode ativar Mn-superóxido dismutase (SOD2), através de sua desacetilação no resíduo lisina evolutivamente conservado de desacetilases dependentes de NAD⁺, sirtuína, nas quais, as sirtuínas 1 e 3, demonstraram regular a atividade de SOD2 para proteger as células musculares do stresse oxidativo. Os genes SIRT1 e SIRT3 podem promover a biogênese mitocondrial ativando o co-ativador 1 alfa do recetor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α), que é um coativador transcricional que regula positivamente as enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase (GPx), catalase e SOD2.

Para avaliação da morte celular, foi feita a adaptação do protocolo do ensaio de libertação de LDH para as culturas organotípicas. Os resultados mostraram que a concentração de 25µM t-BHP induziu um aumento significativo de libertação de LDH e, conseqüentemente morte celular, em relação ao controlo. Outros estudos também mostraram que em células astrogliais de rato tratadas com concentrações mais elevadas de t-BHP (100µM) verificou-se aumento de citotoxicidade, com o aumento da apoptose e do stresse oxidativo em comparação com células do controlo não tratadas [103].

A senescência celular é induzida em contextos fisiológicos, como no envelhecimento relacionado com a idade, e patológicos, como nas doenças neurodegenerativas. São diversos os fatores responsáveis por desencadear a senescência celular. Pode-se dizer que as características do processo de envelhecimento são comuns a todos os tipos de células, entre elas, a disfunção mitocondrial, acumulação intracelular de proteínas oxidadas, metabolismo energético desregulado, mecanismos envolvidos na proteostase - funcionalidade autofagia-lisossoma e proteossoma, inflamação, entre outras. É de suma importância a informação de que senescência celular e envelhecimento não são considerados sinónimos, pois as células podem sofrer senescência em várias fases da vida, além da acumulação de células senescentes não ser linear ao longo do tempo, porém, sabe-se que esse processo é acelerado pelo envelhecimento [8, 53,104,105].

De acordo com Tan FCC., *et al* (2014) [59], o conceito de senescência neuronal é relativamente novo, pois, as características da senescência celular abrangem mais do que apenas a paragem irreversível/permanente do ciclo celular. Uma vez que a função cerebral depende da conectividade da rede neuronal, os efeitos do envelhecimento manifestam-se ao nível da plasticidade sináptica. Estudos sugerem que, dependendo do tipo de senescência, essa paragem pode ocorrer na fase G1 ou G2 do ciclo celular. Como os neurónios são células pós-mitóticas, a senescência neuronal, deve contar com outros mecanismos além da interrupção da proliferação. Entretanto, os dados sobre esse assunto ainda são escassos [53,106]. Dependendo da intensidade do estímulo, a população de células em questão, poderá reagir de diferentes formas, ou seja, o nível de dano que é suportado pelas células poderá conduzi-las à apoptose ou à senescência [7,107].

Para desenvolver um fenótipo de senescência e assim tentar estabelecer um modelo de envelhecimento cerebral, foi usado neste estudo, o marcador padrão de senescência celular, o ensaio da β -galactosidase, para avaliar o aumento da atividade de SA- β -gal [53].

De acordo com os resultados apresentados no ensaio de senescência, observamos que não houve variabilidade na atividade da enzima entre as amostras tratadas e o controlo (não tratado). Curiosamente, o stress oxidativo presente na condição de 25 μ M, não acompanhou a mesma tendência na atividade da SA- β -gal. Pois seria expectável um aumento da expressão de SA- β -gal nas amostras de concentração 25 μ M, já que houve uma tendência de aumento na expressão de SOD2 nesta mesma condição, o que de fato, não ocorreu.

Relativamente à concentração 25 μ M, verificou-se um aumento significativo de morte celular, analisada através dos resultados do ensaio de LDH. Neste caso, os nossos resultados mostram que o tratamento sub-crónico com 25 μ M t-BHP induziu stress oxidativo nas fatias tratadas, diminuiu a viabilidade das células, mas não acompanhou o aumento da atividade da SA- β -gal nas fatias tratadas. Em dissonância, outros estudos reportaram que concentrações superiores e períodos de tratamento mais alargados com t-BHP foram acompanhados pela presença de sinais de senescência e os resultados de morte celular foram proporcionais ao tratamento recebido [6,106].

Era expectável que as células entrassem em senescência através do aumento ROS, já que essa tendência é observada em outros estudos. Contudo, o processo de envelhecimento implica vários mecanismos e o stress oxidativo é apenas uma das vias que podem levar à senescência. É pouco provável que a senescência celular explique todos os fenótipos do envelhecimento, apesar de haver um número considerável de patologias do envelhecimento associadas direta ou indiretamente à senescência, nomeadamente as doenças neurodegenerativas [89,90,108].

Em relação ao comportamento de células neuronais maduras após o tratamento, observamos que a sobrevivência neuronal não foi afetada no que diz respeito às amostras tratadas com concentração 10 μ M, enquanto nas amostras de 25 μ M, apesar de observarmos um aumento de

morte celular, houve também um incremento considerável para células positivas para NeuN. É possível que o stress oxidativo a essa concentração, desencadeie o aumento da expressão de NeuN, que, por ter outras funções ainda não exploradas. Em níveis baixos a moderados, as ROS desempenham um papel importante nos processos celulares normais, atuando como segundos mensageiros em cascatas de sinalização intracelular que medeiam o crescimento celular, neurogênese, além da autofagia, função inflamatória, imunológica e contribuem para a regulação redox geral [66,109,110]. Entretanto, na concentração de 10 μ M quase não houve variabilidade em relação ao controlo. É suposto que o reduzido número de amostras neste estudo nos impede de retirar conclusões mais robustas acerca desta questão.

Relativamente à expressão de DCX, marcador de células precursoras neuronais, verifica-se que a concentração de 25 μ M induz uma diminuição da expressão desta proteína, o que sugere uma tendência para diminuição de neurónios precursores, o que seria suposto, visto que, a concentração utilizada pode afetar a neurogênese. Na concentração de 10 μ M, não se verificou diferença significativa em relação ao controlo (sem tratamento), portanto, a expressão de células precursoras neuronais nesta concentração pode não ter sofrido alterações. Relativamente à neurogênese, sabe-se que a mesma ocorre constitutivamente no cérebro de mamíferos adultos em duas áreas do cérebro, a zona subventricular (SVZ) que reveste os ventrículos laterais e na zona subgranular (SGZ) do giro dentado (DG) do hipocampo. Embora os mecanismos moleculares subjacentes da neurogênese adulta ainda não sejam totalmente conhecidos, as mitocôndrias demonstraram ser um regulador chave do destino das CSNs, onde um desequilíbrio na produção de ROS incidirá nos níveis de stress oxidativo, que irão impactar na regulação da neurogênese [6,27,48,112].

Nos estudos de Santos T., *et al* (2017) [111], verificou-se que, baixos níveis de ROS funcionam como efetores de sinalização em processos como diferenciação, autofagia e adaptação metabólica e níveis de ROS moderados são capazes de induzir diferenciação de CSNs. Em Isaev N.K., *et al* (2013) [28], o aumento ROS e a redução da produção de ATP pelas mitocôndrias (o ATP é necessário para a reparação do DNA) resultam em stress oxidativo que irá prejudicar a neurogênese.

O mecanismo de indução do stress oxidativo foi o método eleito para o presente estudo, porém, este é apenas uma das vias para obtenção de um modelo de senescência. Trabalhos que envolveram modelos de envelhecimento cerebral, utilizaram-se de outros mecanismos, como nos estudos de Bourdenx M., *et al* (2021) [113], onde foi investigado o papel da autofagia mediada por chaperonas (CMA), utilizando modelos de murganhos com bloqueio de CMA sistémico e neuronal. Nesse trabalho foi demonstrado que a perda ou alterações na proteostase leva à alteração da função neuronal, alterações seletivas no proteoma metaestável neuronal e proteotoxicidade, que por sua vez, são características reminiscentes do envelhecimento cerebral [113-118].

Liu X e colaboradores (2022) [118], estabeleceram modelos de envelhecimento *in vivo* e *in vitro* utilizando D-galactose (D-gal) num protocolo de exposição sistémica crónica para induzir senescência prematura em roedores. A senescência induzida pelo D-gal envolve mecanismos subjacentes como a desregulação do metabolismo dos carboidratos, que pode induzir stress oxidativo, apoptose e inflamação.

Outros estudos, como os de Santos S.S., *et al* (2022) [6] e Rabin D.M., *et al* (2013) [106], que trabalharam com modelos *in vitro*, induziram o stress oxidativo através de concentrações de t-BHP mais elevadas, que variavam entre 50µM a 500µM de t-BHP, e tempos de exposição mais alargados, durante 4 a 5 dias, para estabelecer um modelo de envelhecimento. É possível que estes fatores possam ter contribuído para as dificuldades encontradas no desenvolvimento de um modelo de envelhecimento cerebral [59].

Este estudo experimental tem algumas limitações, incluindo o fato de que as culturas organotípicas serem mais sensíveis que outros tipos de culturas, por isso é necessário que as fatias sejam de excelente qualidade para que possam suportar o stress causado pelo tratamento. Por outro lado, a duração do tratamento é um ponto importante, visto que, chegar ao tempo ótimo de tratamento para que o estímulo possa produzir os resultados expectáveis, é determinante para o sucesso do modelo.

Capítulo 6

Perspectivas futuras

Considerando a importância da elucidação das alterações moleculares nos diversos mecanismos envolvidos no envelhecimento cerebral, assim como o desenvolvimento de terapias de doenças neurodegenerativas, estabelecer um modelo de envelhecimento cerebral é uma ferramenta crucial para obtermos avanços nesta área.

O próximo passo, é avaliar quais os outros mecanismos envolvidos no envelhecimento cerebral poderiam ser adicionados a este protocolo para contribuir na sua otimização. Isso poderá ser alcançado através de uma otimização das concentrações testadas, da duração do tratamento, ou da adição de outros mecanismos que levem à senescência, já que existem trabalhos que desenvolveram modelos de envelhecimento cerebral baseados em outros mecanismos ou mesmo combinando mais de um deles. É também fundamental, aumentar o número de amostras nas condições propostas. Para uma avaliação mais robusta do modelo de envelhecimento, será necessário também efetuar análises com mais marcadores para uma melhor compreensão dos efeitos nas CSNs do hipocampo, por imunohistoquímica ou Western blot. Será também importante investigar o envolvimento de outras vias de sinalização, como por exemplo, NOX, P21, P16, P53, Sirt3.

Outro aspeto relevante seria avaliar os efeitos na população de células gliais (astrócitos, microglia, oligodendrócitos) utilizando vários marcadores, como por exemplo Olig2, NG2, Iba1, GFAP.

Para avaliar o stress oxidativo, sugere-se a quantificação de DCFDA/DHE (quantificação de ROS), 8-OXOdG (biomarcador de dano oxidativo ao DNA); utilizar outras técnicas como, Caspase-3 ativada, para melhor caracterizar o efeito de morte celular, e dessa forma, chegarmos ao estabelecimento do modelo de envelhecimento cerebral.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

1. Li Z, Zhang Z, et al. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. Vol.22, Biogerontology. Springer Science and Business Media B.V.; 2021. P.
2. Evanthia DK, Djuro M, Leonidas D, Efstathios GS, Dimitrios GG, Gantenbein Christina K, et al. Aging and Anti-aging Endocrinology: A Combo Overview Title: Aging and Anti-aging Endocrinology. 2017.
3. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. Vol. 153, Cell. Elsevier B.V.; 2013. p. 1194.
4. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M. Hallmarks of Cellular Senescence. Vol. 28, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2018. p. 436–53.
5. Nações Unidas <https://Unric.Org/Pt/Envelhecimento/>, n.d.
6. Santos SS, Moreira JB, Costa M, Rodrigues RS, Sebastião AM, Xapelli S, et al. The mitochondrial antioxidant sirtuin3 cooperates with lipid metabolism to safeguard neurogenesis in aging and depression. Cells. 2022 Jan 1;11(1).
7. Schmeer, Kretz, Wengerodt, Stojiljkovic, Witte. Dissecting Aging and Senescence—Current Concepts and Open Lessons. Cells. 2019 Nov 15;8(11):1446.
8. Chen X, Xie C, Tian W, Sun L, Zheng W, Hawes S, et al. Parkinson’s disease-related Leucine-rich repeat kinase 2 modulates nuclear morphology and genomic stability in striatal projection neurons during aging. Mol Neurodegener. 2020 Dec 19;15(1):12.
9. Galkin F, Mamoshina P, Aliper A, de Magalhães JP, Gladyshev VN, Zhavoronkov A. Biohorology and biomarkers of aging: Current state-of-the-art, challenges and opportunities. Ageing Res Rev. 2020 Jul; 60:101050.
10. Tiwari V, Wilson DM. DNA Damage and Associated DNA Repair Defects in Disease and Premature Aging. Vol. 105, American Journal of Human Genetics. Cell Press; 2019. p. 237–57.
11. Ding H, Zhong Y, Liu N, Wu H, Xu H, Wu Y, et al. Panic disorder aging characteristics: The role of telomerase reverse transcriptase gene and brain function. Front Aging Neurosci. 2022 Aug 5;14.
12. Shay JW. Role of telomeres and telomerase in aging and cancer. Vol. 6, Cancer Discovery. American Association for Cancer Research Inc.; 2016. p. 584–93.

13. Saretzki G, Wan T. Telomerase in Brain: The New Kid on the Block and Its Role in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*. 2021 Apr 29;9(5):490.
14. Yang, J. H., Hayano, M., Griffin, P. T., Amorim, J. A., Bonkowski, M. S., Apostolides, J. K., ... & Sinclair, D. A. (2023). Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging. *Cell*, 186(2), 305-326.
15. Barter JD, Foster TC. Aging in the Brain: New Roles of Epigenetics in Cognitive Decline. *The Neuroscientist*. 2018 Oct 7;24(5):516–25.
16. Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, Martin GM, Poot M, Nanda I, et al. Epigenetic signatures of Werner syndrome occur early in life and are distinct from normal epigenetic aging processes. *Aging Cell*. 2019 Oct 1;18(5).
17. Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., & Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiological reviews*, 99(2), 1047-1078.
18. Nakamura S, Yoshimori T. Autophagy and longevity. Vol. 41, *Molecules and Cells*. Korean Society for Molecular and Cellular Biology; 2018. p. 65–72.
19. Loeffler DA. Influence of Normal Aging on Brain Autophagy: A Complex Scenario. *Front Aging Neurosci*. 2019 Mar 11;11.
20. Gómez-Sintes, R., Ledesma, MD, & Boya, P. (2016). Mecanismos de morte celular lisossomal no envelhecimento. *Revisões de pesquisas sobre envelhecimento*, 32, 150-168.
21. Leeman DS, Hebestreit K, Ruetz T, Webb AE, McKay † Andrew, Pollina EA, et al. Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging [Internet]. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
22. Kane AE, Sinclair DA. Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. Vol. 54, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 61–83.
23. Basisty N, Meyer JG, Schilling B. Protein Turnover in Aging and Longevity. Vol. 18, *Proteomics*. Wiley-VCH Verlag; 2018.
24. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. Vol. 217, *Journal of Cell Biology*. Rockefeller University Press; 2018. p. 51–63.
25. Yao Y, Liang X, Shi Y, Lin Y, Yang J. Osthole delays tert-butyl hydroperoxide-induced premature senescence in neural stem cells. *Cell Reprogram*. 2018 Aug 1;20(4):268–74.
26. Kaushik S, Cuervo AM. Proteostasis and aging. Vol. 21, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2015. p. 1406–15.
27. Isaev NK, Stelmashook E V., Genrikhs EE. Neurogenesis and brain aging. *Rev Neurosci*. 2019 Aug 1;30(6):573–80.

28. Isaev NK, Stelmashook E V., Stelmashook NN, Sharonova IN, Skrebitsky VG. Brain aging and mitochondria-targeted plastoquinone antioxidants of SkQ-type. *Biochemistry (Moscow)*. 2013;78(3):295–300.
29. Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, et al. The aging hippocampus: A multi-level analysis in the rat. *Neuroscience*. 2006;139(4):1173–85.
30. Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis [Internet]. 2003. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2334169100
31. Aimone JB, Wiles J, Gage FH. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. Vol. 9, *Nature Neuroscience*. 2006. p. 723–7.
32. Schouten M, Renate Buijink M, Lucassen PJ, Fitzsimons CP. New neurons in aging brains: Molecular control by small non-coding RNAs. *Frontiers in Neuroscience*. 2012.
33. Katsimpardi L, Lledo PM. Regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. Vol. 53, *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 131–8.
34. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai HH, Wong M, et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*. 2011 Oct 20;478(7369):382–6.
35. Ming G li, Song H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. Vol. 70, *Neuron*. 2011. p. 687–702.
36. Enwere E, Shingo T, Gregg C, Fujikawa H, Ohta S, Weiss S. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *Journal of Neuroscience*. 2004 Sep 22;24(38):8354–65.
37. Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*. 2005;130(4):843–52.
38. Cameron HA, Glover LR. Adult neurogenesis: Beyond learning and memory*. *Annu Rev Psychol*. 2015 Jan 1;66: 53-81.
39. Pozhilenkova EA, Lopatina OL, Komleva YK, Salmin V V., Salmina AB. Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain. *Rev Neurosci*. 2017 May 24;28(4):397–415.
40. Conover JC, Todd KL. Development and aging of a brain neural stem cell niche. Vol. 94, *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc.; 2017. p. 9–13.
41. Kalamakis G, Brüne D, Ravichandran S, Bolz J, Fan W, Ziebell F, et al. Quiescence Modulates Stem Cell Maintenance and Regenerative Capacity in the Aging Brain. *Cell*. 2019 Mar;176(6):1407-1419.e14.

42. Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109–1112.43.
43. Kauppila TES, Kauppila JHK, Larsson NG. Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metab.* 2017 Jan;25(1):57–71.
44. Kauppila TES, Bratic A, Jensen MB, Baggio F, Partridge L, Jasper H, et al. Mutations of mitochondrial DNA are not major contributors to aging of fruit flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018 Oct 9;115(41).
45. Casadomé-Perales Á, Naya S, Fernández-Martínez E, Mille BG, Guerrero-Valero M, Peinado H, et al. Neuronal Prosurvival Role of Ceramide Synthase 2 by Oligodendrocyte-to-Neuron Extracellular Vesicle Transfer. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 22;24(6):5986.
46. Arneth, B. M. (2019). Impact of B cells to the pathophysiology of multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 16, 1-9.
47. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A (2012) Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* 4:166–175. <https://doi.org/10.18632/aging.100444>.
48. Bond AM, Ming GL, Song H. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. Vol. 17, *Cell Stem Cell.* Cell Press; 2015. p. 385–95.
49. Hernandez-Segura A, de Jong T V., Melov S, Guryev V, Campisi J, Demaria M. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology.* 2017 Sep 11;27(17):2652-2660.e4.47.
50. Acosta JC, O’Loughlen A, Banito A, Guijarro M V., Augert A, Raguz S, et al. Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell.* 2008 Jun 13;133(6):1006–18.
51. Wedel S, Martic I, Hrapovic N, Fabre S, Madreiter-Sokolowski CT, Haller T, et al. tBHP treatment as a model for cellular senescence and pollution-induced skin aging. *Mech Ageing Dev.* 2020 Sep 1;190.
52. Lin R, Iacovitti L. Classic and novel stem cell niches in brain homeostasis and repair. Vol. 1628, *Brain Research.* Elsevier; 2015. p. 327–42.
53. Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Dudkowska M, Krzystyniak A, Mosieniak G, Wesierska M, et al. Cellular Senescence in Brain Aging. *Front Aging Neurosci.* 2021 Feb 25;13.
54. Gewirtz, D. A. (2013). Autophagy and senescence: a partnership in search of definition. *Autophagy*, 9(5), 808-812.
55. Uday Bhanu M, Mandraju RK, Bhaskar C, Kondapi AK. Cultured cerebellar granule neurons as an in vitro aging model: Topoisomerase II β as an additional biomarker in DNA repair and aging. *Toxicology in Vitro.* 2010 Oct;24(7):1935–45.

56. Dong W, Cheng S, Huang F, Fan W, Chen Y, Shi H, et al. Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. *Medical Science Monitor*. 2011;17(4):BR91–6.
57. Geng YQ, Guan JT, Xu XH, Fu YC. Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jun 11;396(4):866–9.
58. Wengerodt D, Schmeer C, Witte OW, Kretz A. Amitosenescence and Pseudomitosenescence: Putative New Players in the Aging Process. *Cells*. 2019 Nov 29;8(12):1546.
59. Tan FCC, Hutchison ER, Eitan E, Mattson MP. Are there roles for brain cell senescence in aging and neurodegenerative disorders? *Biogerontology*. 2014 Dec 11;15(6):643–60.
60. Ogrodnik M, Evans SA, Fielder E, Victorelli S, Kruger P, Salmonowicz H, et al. Whole-body senescent cell clearance alleviates age-related brain inflammation and cognitive impairment in mice. *Aging Cell*. 2021 Feb 20;20(2).
61. Chinta SJ, Woods G, Demaria M, Rane A, Zou Y, McQuade A, et al. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep*. 2018 Jan;22(4):930–40.
62. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ. Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*. 2018 Oct 19;562(7728):578–82.
63. Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol*. 2013 Aug 16;15(8):978–90.
64. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*. 1992 Sep;275(3–6):257–66.
65. Ionescu-Tucker A, Cotman CW. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2021 Nov; 107:86–95.
66. Ngo V, Duennwald ML. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. Vol. 11, *Antioxidants*. MDPI; 2022.
67. Imlay, J. A., Chin, S. M., & Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240(4852), 640–642.
68. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2016 Dec;1863(12):2977–92.

69. Huang C, Wen C, Yang M, Gan D, Fan C, Li A, et al. Lycopene protects against t-BHP-induced neuronal oxidative damage and apoptosis via activation of the PI3K/Akt pathway. *Mol Biol Rep.* 2019 Jun 1;46(3):3387–97.
70. Lipinski MM, Zheng B, Lu T, Yan Z, Py BF, Ng A, et al. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010 Aug 10;107(32):14164–9.
71. Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, et al. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature.* 2004 Jun 9;429(6994):883–91.
72. Teresa A, Ramos C, Farmacêuticas C. Revisão sistemática sobre as aplicações terapêuticas da associação senolítica “Dasatinib e Quercetina” em patologias características do envelhecimento. *Experiência Profissionalizante na vertente de Investigação, Farmácia Hospitalar e Farmácia Comunitária.*
73. Wyss-Coray T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. Vol. 539, *Nature.* Nature Publishing Group; 2016. p. 180–6.
74. Kritsilis M, Rizou S V., Koutsoudaki PN, Evangelou K, Gorgoulis VG, Papadopoulos D. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2018.
75. Lees, H., Walters, H., & Cox, L. S. (2016). Animal and human models to understand ageing. *Maturitas*, 93, 18-27.
76. Balistreri CR. Anti-Inflamm-Ageing and/or Anti-Age-Related Disease Emerging Treatments: A Historical Alchemy or Revolutionary Effective Procedures? Vol. 2018, *Mediators of Inflammation.* Hindawi Limited; 2018.
77. Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. Vol. 12, *Ageing Research Reviews.* 2013. p. 8–21.
78. Kõks S, Dogan S, Tuna BG, González-Navarro H, Potter P, Vandenbroucke RE. Mouse models of ageing and their relevance to disease. Vol. 160, *Mechanisms of Ageing and Development.* Elsevier Ireland Ltd; 2016. p. 41–53.
79. Xu, T. T., Li, H., Dai, Z., Lau, G. K., Li, B. Y., Zhu, W. L., ... & Zhang, S. J. (2020). Spermidine and spermine delay brain aging by inducing autophagy in SAMP8 mice. *Aging (Albany NY)*, 12(7), 6401.
80. Tanvig M, Blaabjerg M, Andersen RK, Villa A, Rosager AM, Poulsen FR, et al. A brain slice culture model for studies of endogenous and exogenous precursor cell migration in the rostral migratory stream. *Brain Res.* 2009 Oct 12; 1295:1–12.

81. Madill M, Fitzgerald D, O'Connell KE, Dev KK, Shen S, FitzGerald U. In vitro and ex vivo models of multiple sclerosis. Vol. 21, Drug Discovery Today. Elsevier Ltd; 2016. p. 1504–11.
82. Bernardino L, Balosso S, Ravizza T, Marchi N, Ku G, Randle JC, et al. Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X 7 receptor-mediated IL-1 β release. *J Neurochem.* 2008 Jul;106(1):271–80.
83. Machado-Pereira M, Santos T, Ferreira L, Bernardino L, Ferreira R. Intravenous administration of retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles prevents ischemic injury in the immature brain. *Neurosci Lett.* 2018 Apr; 673:116–21.
84. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018 Jun 1;2018(6):pdb. proto95497.
85. Machado-Oliveira G, Ramos C, Marques ARA, Vieira O V. Cell Senescence, Multiple Organelle Dysfunction and Atherosclerosis. *Cells.* 2020 Sep 23;9(10):2146.
86. Vizioli MG, Liu T, Miller KN, Robertson NA, Gilroy K, Lagnado AB, et al. Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. *Genes Dev.* 2020 Mar 1;34(5–6):428–45.
87. Kwon SM, Hong SM, Lee YK, Min S, Yoon G. Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep.* 2019 Jan 31;52(1):5–12.
88. Song S, Lam EWF, Tchkonina T, Kirkland JL, Sun Y. Senescent Cells: Emerging Targets for Human Aging and Age-Related Diseases. *Trends Biochem Sci.* 2020 Jul;45(7):578–92.
89. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013 Feb 10;75(1):685–705.
90. Jannone, G., Rozzi, M., Najimi, M., Decottignies, A., & Sokal, E. M. (2020). An optimized protocol for histochemical detection of senescence-associated beta-galactosidase activity in cryopreserved liver tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 68(4), 269-278.
91. Konovalova, J., Gerasymchuk, D., Parkkinen, I., Chmielarz, P., & Domanskyi, A. (2019). Interplay between MicroRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 6055.
92. Lin MT, Beal MF Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas. *Natureza.* 2006; 443 :787–795. doi: 10.1038/nature05292.
93. Blesa J., Trigo-Damas I., Quiroga-Varela A., Jackson-Lewis VR Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frente. Neuroanat.* 2015; 9: 91. doi: 10.3389/fnana.2015.00091.

94. Tönnies, E., & Trushina, E. (2017). Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 1105-1121.
95. Kumar, A., & Ratan, R. R. (2016). Oxidative stress and Huntington's disease: The good, the bad, and the ugly. *Journal of Huntington's disease*, 5(3), 217-237.96.
96. Niedzielska, E., Smaga, I., Gawlik, M., Moniczewski, A., Stankowicz, P., Pera, J., & Filip, M. (2016). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology*, 53, 4094-4125.
97. Burbulla LF, Song P., Mazzulli JR, Zampese E., Wong YC, Jeon S., Santos DP, Blanz J., Obermaier CD, Strojny C., et al. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science*. 2017; 357 :1255–1261. doi: 10.1126/science.aam9080.
98. Cobley, J. N., Fiorello, M. L., & Bailey, D. M. (13). reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol*. 2018; 15: 490–503.
99. Pacelli C., Giguere N., Bourque MJ, Levesque M., Slack RS, Trudeau LE. Elevated mitochondrial bioenergetics and axonal arborization size are major contributors to the vulnerability of dopaminergic neurons. *Atual Biol*. 2015; 25 :2349–2360. doi: 10.1016/j.cub.2015.07.050.
100. Liu Z., Zhou T., Ziegler AC, Dimitrion P., Zuo L. Estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas: de mecanismos moleculares a aplicações clínicas. *Óxido. Med. Celular Longev*. 2017; 2017 : 2525967. doi: 10.1155/2017/2525967.
101. Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N. & Aigner, L. (2005). Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 21(1), 1-14.
102. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. Vol. 552, *Journal of Physiology*. 2003. p. 335–44.
103. Yeh YC, Liu TJ, Lai HC. Pathobiological mechanisms of endothelial dysfunction induced by tert-butyl hydroperoxide via apoptosis, necrosis and senescence in a rat model. *Int J Med Sci*. 2020;17(3):368–82.
104. Tchkonina, T., Zhu, Y., Van Deursen, J., Campisi, J., & Kirkland, J. L. (2013). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of clinical investigation*, 123(3), 966-972.

105. He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in health and disease. *Cell*, 169(6), 1000-1011.
106. Rabin, D. M., Rabin, R. L., Blenkinsop, T. A., Temple, S., & Stern, J. H. (2013). Chronic oxidative stress upregulates Drusen-related protein expression in adult human RPE stem cell-derived RPE cells: a novel culture model for dry AMD. *Aging (Albany NY)*, 5(1), 51.
107. Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Mel'nikova, T. I., Porozov, Y. B., & Terentiev, A. A. (2019). Oxidative stress and advanced lipoxidation and glycation end products (ALEs and AGEs) in aging and age-related diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019.
108. Zhu, Y., Armstrong, J. L., Tchkonina, T., & Kirkland, J. L. (2014). Cellular senescence and the senescent secretory phenotype in age-related chronic diseases. *Current opinion in clinical nutrition & metabolic care*, 17(4), 324-328.
109. Bae, YS; Ah, H.; Rhee, SG; Yoo, YD Regulação da geração de espécies reativas de oxigênio na sinalização celular. *Mol. Células* 2011 , 32 , 491–509.
110. Finkel, T. Transdução de sinal por espécies reativas de oxigênio. *J. Cell Biol.* 2011, 194 , 7–15.
111. Santos, T., Ferreira, R., Quartin, E., Boto, C., Saraiva, C., Bragança, J., ... & Bernardino, L. (2017). Blue light potentiates neurogenesis induced by retinoic acid-loaded responsive nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 59, 293-302.
112. He, Q., Sawada, M., Yamasaki, N., Akazawa, S., Furuta, H., Uenishi, H., ... & Moriya, J. (2020). Neuroinflammation, oxidative stress, and neurogenesis in a mouse model of chronic fatigue syndrome, and the treatment with Kampo medicine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 43(1), 110-115.
113. Bourdenx, M., Martín-Segura, A., Scrivo, A., Rodriguez-Navarro, J. A., Kaushik, S., Tasset, I., ... & Cuervo, A. M. (2021). Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome. *Cell*, 184(10), 2696-2714.
114. Hsieh, H. M., Wu, W. M., & Hu, M. L. (2011). Genistein attenuates D-galactose-induced oxidative damage through decreased reactive oxygen species and NF-κB binding activity in neuronal PC12 cells. *Life Sciences*, 88(1-2), 82-88.
115. Yang W, Shi L, Chen L, Zhang B, Ma K, Liu Y, Qian Y. Protective effects of perindopril on d-galactose and aluminum trichloride induced neurotoxicity via the apoptosis of

mitochondria-mediated intrinsic pathway in the hippocampus of mice. *Brain Res Bull.* 2014;109:46-53.

116. Chang L, Liu X, Liu J, Li H, Yang Y, Liu J, Guo Z, Xiao K, Zhang C, Liu J, Zhao-Wilson X, Long J. D-galactose induces a mitochondrial complex I deficiency in mouse skeletal muscle: potential benefits of nutrient combination in ameliorating muscle impairment. *Journal of medicinal food.* 2014;17(3):357-64.

117. Budni J, Pacheco R; Silva S; Garcez ML, Mina F, Bellettini-Santos T, Medeiros J; Voss BC; Steckert AV; Valvassori SS; Quevedo J. Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. *Behavioral Brain Res.* 2016; 302 (2016) 35–43.

118. Liu, X., Dilxat, T., Shi, Q., Qiu, T., & Lin, J. (2022). The combination of nicotinamide mononucleotide and lycopene prevents cognitive impairment and attenuates oxidative damage in D-galactose induced aging models via Keap1-Nrf2 signaling. *Gene*, 822, 146348.